

## DESCRIPTION

## MODIFIED ANTIBODY AGAINST CD22 AND UTILIZATION THEREOF

5    Technical Field

The present invention relates to minibodies of antibodies that recognize CD22.

Background Art

CD22 is a molecule belonging to the Ig superfamily. CD22 is specifically expressed in 10 B-cells, and is thus considered to function in suppressing signals from B-cell receptors.

Furthermore, CD22 is known to be expressed in a variety of B-cell leukemia cells and malignant lymphoma cells in patients with hematopoietic disease. Since soluble CD22 has not been detected in serum, CD22-targeted antibody therapy might be possible (Non-Patent Documents 1 to 5).

15       Regarding the use of antibodies against CD22 in hematopoietic tumors, there are some reports showing the possibility of clinical use of humanized anti-CD22 antibodies for B-cell malignancies (Patent Documents 1 and 2). However, these documents do not disclose a relationship between anti-CD22 antibodies and apoptosis-inducing activity.

When anti-CD22 antibodies were chemically crosslinked using a crosslinking agent, a 20 growth-suppressing effect was observed on the lymphoma cell line Daudi, whereas this effect was not observed in parent anti-CD22 antibodies alone (Non-Patent Document 6). In addition, this report makes no mention of apoptosis induction.

Minibodies are thought to have several advantages in clinical applications as compared 25 to whole antibodies. Indeed, a method of apoptosis induction in tumor cells using crosslinked antibody structures, such as IgG or Fab'2 (without Fc fragments), against several kinds of antigens including CD22 has been disclosed (Patent Document 3). However, in this document, antibodies against CD22 have not actually been produced, and thus, their apoptosis-inducing activities have not been examined.

Therefore, there have been no reports of using anti-CD22 minibodies in this way to 30 induce apoptosis of tumor cells.

The prior art literature relating to the invention of this application is shown below.

[Non-Patent Document 1] Nishii Kazuhiro, CURRENT THERAPY Vol. 20 No. 1 47-50

[Non-Patent Document 2] Tedder *et al.*, Ann Rev Immunol 15:481-504 (1997)

[Non-Patent Document 3] Clark EA, J Immunol 150:4715-4718 (1993)

35 [Non-Patent Document 4] Sato *et al.*, Immunity 5:551-562 (1996)

[Non-Patent Document 5] Li *et al.*, Cell Immunol 118:85-99 (1993)

[Non-Patent Document 6] Ghetie *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7509-7514 (1997)

[Patent Document 1] Published Japanese Translation of International Publication No. 2001-518930

[Patent Document 2] Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 5 10-505231

[Patent Document 3] WO 99/02567

#### Disclosure of the Invention

A first objective of this invention is to provide minibodies converted from antibodies 10 that recognize CD22. A further objective of this invention is to provide novel methods for treating hematopoietic tumors using these minibodies.

In order to generate minibodies against CD22, that is, to generate “CD22 diabodies” in which the variable regions of heavy- and light-chains are linked by a 5-mer amino acid linker, the present inventors first designed the nucleotide sequences of two CD22 diabodies using the 15 previously reported sequences of two anti-CD22 antibodies, and synthesized them. (A Flag tag was included in the diabodies to facilitate purification.) Next, they inserted the cDNAs into animal cell expression vectors, respectively. After that, these vectors were transfected into DG44 or COS7 cells, and the diabodies produced in the culture supernatant were purified by anti-Flag M2 agarose affinity-purification.

Next, the present inventors examined the activity of two resultant diabodies in 20 cell-binding and cell-death (apoptosis) induction in lymphoma cell lines. The results showed that both of these diabodies bind to cells of the B-lymphoma cell line “Raji”, and that both have activity to induce apoptosis in Raji cells and Daudi cells, which are also a B-lymphoma cell line. These results show that minibodies of antibodies that recognize CD22 can be used as 25 apoptosis-inducing agents against tumor cells such as lymphoma cells.

Specifically, the present invention provides following (1) to (12):

- (1) A minibody that recognizes CD22.
- (2) The minibody of claim 1, wherein the minibody is a diabody.
- (3) A minibody of any one of (a) to (f):
  - (a) a minibody comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 or 3;
  - (b) a minibody functionally equivalent to the minibody of (a), and comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 or 3 wherein one or more amino acids are substituted, inserted, deleted, and/or added;
  - (c) a minibody comprising the amino acid sequences of a CDR of SEQ ID NOS: 5 and 35 7;
  - (d) a minibody functionally equivalent to the minibody of (c), and comprising the amino

acid sequence of a CDR of SEQ ID NOs: 5 and 7 wherein one or more amino acids are substituted, inserted, deleted, and/or added;

(e) a minibody comprising the amino acid sequences of a CDR of SEQ ID NOs: 9 and 11; and

5 (f) a minibody functionally equivalent to the minibody of (c), and comprising the amino acid sequence of a CDR of SEQ ID NOs: 9 and 11 wherein one or more amino acids are substituted, inserted, deleted, and/or added.

(4) A method for producing a CD22-recognizing antibody with increased activity by converting a CD22-recognizing antibody to a low-molecular-weight antibody.

10 (5) The method of claim 4, wherein the conversion is conversion to a diabody.

(6) The method of claim 4 or 5, wherein the activity is an apoptosis-inducing activity.

(7) An apoptosis-inducing agent comprising the minibody of any one of claims 1 to 3 or the minibody produced by the method of any one of claims 4 to 6, as an active ingredient.

(8) The apoptosis-inducing agent of claim 7 that induces tumor cell apoptosis.

15 (9) The apoptosis-inducing agent of claim 8, wherein the tumor cell is a lymphoma or leukemic cell.

(10) An antitumor agent comprising the minibody of any one of claims 1 to 3 or the minibody produced by the method of any one of claims 4 to 6, as an active ingredient.

(11) The antitumor agent of claim 10, wherein the tumor is a blood tumor.

20 (12) The apoptosis-inducing agent of any one of claims 7 to 9, wherein the antibody is a diabody.

(13) The antitumor agent of claim 10 or 11, wherein the antibody is a diabody.

The present invention provides minibodies that recognize CD22. The minibodies of this invention are useful in that their activities are enhanced. Herein, the term "activities" refers to biological actions caused by antibody binding to antigens. Specific examples include apoptosis-inducing actions and anti-tumor actions.

The cells to be targeted by apoptosis-inducing action, anti-tumor action, and so on are not particularly limited, but tumor cells are preferable. Specific examples of the tumor cells are most preferably lymphoma cells and leukemia cells.

In the present invention, administration of minibodies that recognize CD22 can treat or prevent diseases such as tumors, including blood tumors (specifically, leukemia, myelodysplastic syndrome, malignant lymphoma, chronic myeloid leukemia, abnormal plasma cells (such as multiple myeloma or macroglobulinemia), myeloproliferative disease (such as polycythemia vera, essential thrombocythemia, or idiopathic myelofibrosis), or such), and autoimmune diseases (specifically, rheumatism, autoimmune hepatitis, autoimmune thyroiditis, autoimmune

bullous diseases, autoimmune adrenal disease, autoimmune hemolytic anemia, autoimmune thrombocytopenic purpura, autoimmune atrophic gastritis, autoimmune neutropenia, autoimmune orchitis, autoimmune encephalomyelitis, autoimmune receptor disease, autoimmune infertility, Crohn's disease, systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis, Basedow's disease, 5 juvenile diabetes, Addison's disease, myasthenia gravis, lens-induced uveitis, psoriasis, and Behchet's disease).

In the present invention, CD22 refers to a molecule that belongs to the Ig superfamily, consists of seven Ig-like domains, and is genetically located at 19q13.1 (Tedder *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 15:481-504 (1997)).

10 In the present invention, a minibody comprises an antibody fragment lacking a portion of a whole antibody (for example, whole IgG). The minibodies of the present invention are not particularly limited, so long as they can bind an antigen. There are no particular limitations on the antibody fragments of the present invention, so long as they are portions of a whole antibody, and preferably contain a heavy chain variable region (VH) or a light chain variable region (VL).  
15 More preferably, the antibody fragments contain both a heavy chain variable region (VH) and a light chain variable region (VL). Specific examples of the antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')2, Fv, and scFv (single chain Fv), but are preferably scFv (Huston, J. S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883; Plickthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol. 113, Resenburg and Moore Ed., Springer Verlag, New York, pp. 269-315, (1994)). Such antibody fragments can be prepared by treating an antibody with an enzyme, such as papain or pepsin for example, to generate antibody fragments, or by constructing genes that encode these antibody fragments, introducing them into expression vectors, and then expressing them in appropriate host cells (see, for example, Co, M. S. *et al.*, 1994, J. Immunol. 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., 1989, Methods Enzymol. 178, 476-496;  
20 Pluckthun, A. and Skerra, A., 1989, Methods Enzymol. 178, 497-515; Lamoyi, E., 1986, Methods Enzymol. 121, 652-663; Rousseaux, J. *et al.*, 1986, Methods Enzymol. 121, 663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W., 1991, Trends Biotechnol. 9, 132-137).

30 The minibodies of this invention preferably have smaller molecular weights than a whole antibody, however, they may form multimers including dimers, trimers, and tetramers, and their molecular weights may become greater than that of a whole antibody.

A preferred minibody of this invention is an antibody comprising two or more antibody VHs and two or more antibody VLs, in which each of these variable regions is linked directly or indirectly via linkers or such. Such linkages may be covalent bonds or non-covalent bonds, or may be both. An even more preferable minibody is an antibody comprising two or more VH-VL pairs formed by non-covalent bonds between VH and VL. In this case, the distance between one VH-VL pair and another VH-VL pair is preferably shorter in a minibody than in a  
35

whole antibody.

A particularly favorable minibody of this invention is a diabody. A diabody is a dimer formed by bonding two fragments, in which a variable region is linked to another variable region via a linker or such (for example, scFv) (hereinafter referred to as diabody-constituting fragments), and usually comprises two VLs and two VHs (P. Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6444-6448 (1993); EP404097; WO93/11161; Johnson *et al.*, Method in Enzymology, 203, 88-98, (1991); Holliger *et al.*, Protein Engineering, 9, 299-305, (1996); Perisic *et al.*, Structure, 2, 1217-1226, (1994); John *et al.*, Protein Engineering, 12(7), 597-604, (1999); Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90, 6444-6448, (1993); Atwell *et al.*, Mol. Immunol. 33, 1301-1312, (1996)). The bonds between the diabody-constituting fragments may be non-covalent or covalent, but are preferably non-covalent.

Alternatively, diabody-constituting fragments may be bound by a linker or such to form a single chain diabody (sc diabody). In such cases, linking the diabody-constituting fragments using a long linker of about 20 amino acids allows diabody-constituting fragments on the same chain to form a dimer via non-covalent bonds to each other.

Diabody-constituting fragments include those with a linked VL-VH, linked VL-VL, and linked VH-VH, and are preferably those with a linked VH-VL. In the diabody-constituting fragments, the linker used to link a variable region to a variable region is not particularly limited, but is preferably a linker short enough to prevent non-covalent bonding between variable regions in the same fragment. The length of such a linker can be appropriately determined by those skilled in the art, and is ordinarily 2 to 14 amino acids, preferably 3 to 9 amino acids, and most preferably 4 to 6 amino acids. In this case, linkers between a VL and VH encoded on the same fragment are short, and thus a VL and VH on the same strand do not form a non-covalent bond nor a single-chain V region fragment; rather, the fragment forms a dimer with another fragment via non-covalent bonding. Furthermore, according to the same principle as in diabody construction, three or more diabody-constituting fragments may be bonded to form multimeric antibodies, such as trimers and tetramers.

Without limitation, examples of the diabodies of this invention are shown below:

1. diabodies comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 or 3;
- 30 2. diabodies functionally equivalent to a diabody comprising the sequence of SEQ ID NO: 1 or 3, and comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 or 3 wherein one or more amino acids are mutated (substituted, deleted, inserted, and/or added);
3. diabodies comprising the amino acid sequences of the CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 5 and the CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 7;
- 35 4. diabodies functionally equivalent to a diabody comprising the sequences of the CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 5 and the CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 7,

- and comprising the amino acid sequences of the CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 5 and the CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 7 wherein one or more amino acids are mutated (substituted, deleted, inserted, and/or added);
5. diabodies comprising the amino acid sequences of the CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 9 and the CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 11; and
6. diabodies functionally equivalent to a diabody comprising the sequences of the CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 9 and the CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 11, and comprising the amino acid sequences of the CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 9 and the CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 11 wherein one or more amino acids are mutated (substituted, deleted, inserted, and/or added).

10  
15  
Herein, “functionally equivalent” means that the diabody of interest has an activity equivalent to an activity of a diabody comprising the sequence of SEQ ID NO: 1 or 3, a diabody comprising the sequences of the CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 5 and the CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 7, or a diabody comprising the sequences of the CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 9 and the CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 11 (for example, CD22 binding activity, and apoptosis-inducing activity).

The number of mutated amino acids is not particularly limited, but may ordinarily be 30 amino acids or less, preferably 15 amino acids or less, and more preferably five amino acids or less (for example, three amino acids or less). The amino acids are preferably mutated or modified in a way that conserves the properties of the amino acid side chain. Examples of amino acid side chain properties are: hydrophobic amino acids (A, I, L, M, F, P, W, Y, and V), hydrophilic amino acids (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, and T), amino acids comprising the following side chains: aliphatic side chains (G, A, V, L, I, and P); hydroxyl-containing side chains (S, T, and Y); sulfur-containing side chains (C and M); carboxylic acid- and amide-containing side chains (D, N, E, and Q); basic side chains (R, K, and H); aromatic ring-containing side chains (H, F, Y, and W) (amino acids are represented by one-letter codes in parentheses). Polypeptides comprising a modified amino acid sequence, in which one or more amino acid residues is deleted, added, and/or replaced with other amino acids, are known to 20 retain their original biological activity (Mark, D. F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5662-5666 (1984); Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research 10, 6487-6500 (1982); Wang, A. *et al.*, Science 224, 1431-1433; Dalbadie-McFarland, G. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6409-6413 (1982)).

25  
30  
35  
Furthermore, a diabody comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 or 3, a diabody comprising the sequences of the CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 5 and the CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 7, or a diabody comprising the sequences of the CDR

(or variable region) of SEQ ID NO: 9 and the CDR (or variable region) of SEQ ID NO: 11 may be humanized or chimerized to reduce heterologous antigenicity against humans.

In the amino acid sequence corresponding to the variable region of SEQ ID NO: 5, amino acids 31 to 35 correspond to CDR1, amino acids 50 to 66 correspond to CDR2, and amino acids 99 to 105 correspond to CDR3. In the amino acid sequence corresponding to the variable region of SEQ ID NO: 7, amino acids 24 to 40 correspond to CDR1, amino acids 56 to 62 correspond to CDR2, and amino acids 95 to 103 correspond to CDR3. In the amino acid sequence corresponding to the variable region of SEQ ID NO: 9, amino acids 31 to 35 correspond to CDR1, amino acids 50 to 66 correspond to CDR2, and amino acids 99 to 112 correspond to CDR3. In the amino acid sequence corresponding to the variable region of SEQ ID NO: 11, amino acids 24 to 34 correspond to CDR1, amino acids 50 to 56 correspond to CDR2, and amino acids 89 to 97 correspond to CDR3.

In the present invention, the CD22-recognizing minibodies specifically bind to CD22. They are not particularly limited, so long as they have a biological action. The minibodies of this invention can be prepared by methods well known to those skilled in the art. For example, as described in the Examples, the antibodies can be prepared based on a sequence of a CD22-recognizing antibody (particularly a variable region sequence or a CDR sequence), using genetic engineering techniques known to those skilled in the art.

A previously known antibody sequence can be used for the sequence of the CD22-recognizing antibody, or an anti- CD22 antibody can be prepared by a method well known to those skilled in the art using CD22 as the antigen, and then the sequence of this antibody can be obtained and used. Specifically, for example, this can be performed as follows: CD22 protein or its fragment is used as a sensitizing antigen to perform immunizations according to conventional immunization methods, the obtained immunocytes are fused with well-known parent cells according to conventional cell fusion methods, and monoclonal antibody-producing cells (hybridomas) are then screened by ordinary screening methods. Antigens can be prepared by known methods, such as methods using baculoviruses (WO98/46777 and such). Hybridomas can be prepared, for example, according to the method of Milstein *et al.* (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73:3-46). When the antigen has low immunogenicity, immunization can be performed using the antigen bound to an immunogenic macromolecule, such as albumin. Thereafter, cDNAs of the variable region (V region) of the antibody are synthesized from the mRNAs of the hybridomas using reverse transcriptase, and the sequences of the obtained cDNAs can be determined by known methods.

Antibodies that recognize CD22 are not particularly limited, so long as they bind to CD22. Mouse antibodies, rat antibodies, rabbit antibodies, sheep antibodies, human antibodies, and such may be used as necessary. Alternatively, artificially modified, genetically

recombinant antibodies, such as chimeric and humanized antibodies, may be used to reduce heterologous antigenicity against humans. These modified antibodies can be produced using known methods. A chimeric antibody is an antibody comprising the variable regions of the heavy and light chains of an antibody from a non-human mammal such as a mouse, and the constant regions of the heavy and light chains of a human antibody. A chimeric antibody can be produced by linking a DNA encoding the variable regions of a mouse antibody with a DNA encoding the constant regions of a human antibody, incorporating this into an expression vector, and then introducing the vector to a host.

Humanized antibodies are also referred to as "reshaped human antibodies". Such humanized antibodies are obtained by transferring the CDR of an antibody derived from a non-human mammal, for example a mouse, to the CDR of a human antibody, and general gene recombination procedures for this are also known. Specifically, a DNA sequence designed to link a murine antibody CDR to the framework region (FR) of a human antibody can be synthesized by PCR, using primers prepared from several oligonucleotides containing overlapping portions of terminal regions. The obtained DNA is linked to a DNA encoding human antibody constant regions, and this is then integrated into an expression vector, and the antibody is produced by introducing this vector into host cells (see European Patent Application EP 239400, and International Patent Application WO 96/02576). The human antibody FR to be linked via the CDR is selected so the CDR forms a favorable antigen-binding site. To form a suitable antigen-binding site, amino acids in the framework region of the antibody variable region may be substituted in the CDR of the reshaped human antibody, as necessary (Sato, K. *et al.*, 1993, *Cancer Res.* 53, 851-856).

These chimeric antibodies and humanized antibodies can be chimerized, humanized, and such after their molecular weight is reduced, or their molecular weight can be reduced after they have been chimerized, humanized, or such.

Methods for obtaining human antibodies are also known. For example, human lymphocytes can be sensitized *in vitro* with a desired antigen, or with cells expressing the desired antigen, and the sensitized lymphocytes can be fused with human myeloma cells, such as U266, to obtain the desired human antibody with antigen-binding activity (Examined Published Japanese Patent Application No. (JP-B) Hei 1-59878). Further, a desired human antibody can be obtained by using a desired antigen to immunize transgenic animals that have a full repertoire of human antibody genes (see International Patent Application WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, and WO 96/33735). Furthermore, techniques for obtaining human antibodies by panning using a human antibody library are also known. For example, variable regions of human antibodies can be expressed as single chain antibodies (scFvs) on the surface of phages using phage display methods, and phages that bind to antigens

can be selected. The DNA sequences that encode the variable regions of human antibodies that bind an antigen can be determined by analyzing the genes of the selected phages. By determining the DNA sequences of the scFvs that bind to the antigens, appropriate expression vectors into which relevant sequences are inserted can be produced to yield human antibodies.

5 These methods are already known, and are detailed in the following publications: WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, and WO 95/15388.

The antibodies of this invention may be conjugated antibodies that are bonded to various molecules, such as polyethylene glycol (PEG), radioactive substances, and toxins. Such conjugate antibodies can be obtained by performing chemical modifications on the 10 obtained antibodies. Methods for antibody modification are established in this field. The term "antibody" in this invention includes such conjugate antibodies.

The present invention includes DNAs that encode the antibodies of this invention. This invention also includes DNAs encoding antibodies that hybridize under stringent conditions to the aforementioned DNAs, and have antigen-binding capacity and activity. Hybridization 15 techniques (Sambrook, J. *et al.*, Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) are well known to those skilled in the art, and hybridization conditions can be selected appropriately by those skilled in the art. Such hybridization conditions include, for example, conditions of low stringency. Examples of conditions of low stringency include post-hybridization washing in 0.1x SSC and 0.1% SDS at 42°C, and preferably in 0.1x SSC and 20 0.1% SDS at 50°C. More preferable hybridization conditions include those of high stringency. Highly stringent conditions include, for example, washing in 5x SSC and 0.1% SDS at 65°C. In these conditions, the higher the temperature, the higher the expectation of efficiently obtaining DNAs with a high homology. However, several factors, such as temperature and salt concentration, can influence hybridization stringency, and those skilled in the art can suitably 25 select these factors to achieve similar stringencies.

The DNAs of this invention are used for *in vivo* and *in vitro* production of the antibodies of this invention, and for other applications, such as gene therapy. The DNAs of this invention may be in any form, so long as they encode the antibodies of this invention. More specifically, they may be cDNAs synthesized from mRNAs, genomic DNAs, chemically synthesized DNAs, 30 or such. Furthermore, the DNAs of this invention include any nucleotide sequence based on the degeneracy of the genetic code, so long as they encode the antibodies of this invention.

The antibodies of this invention can be produced by methods well known to those skilled in the art. More specifically, a DNA of an antibody of interest is incorporated into an expression vector. In so doing, the DNA is incorporated into the expression vector and 35 expressed under the control of an expression regulatory region such as an enhancer or promoter. Next, antibodies can be expressed by transforming host cells with this expression vector. In this

regard, appropriate combinations of hosts and expression vectors can be used.

The vectors include, for example, M13 vectors, pUC vectors, pBR322, pBluescript, and pCR-Script. In addition to the above vectors, for example, pGEM-T, pDIRECT, and pT7 can also be used for the subcloning and excision of cDNAs.

When using vectors to produce the antibodies of this invention, expression vectors are particularly useful. When an expression vector is expressed in *E. coli*, for example, it should have the above characteristics in order to be amplified in *E. coli*. Additionally, when *E. coli* such as JM109, DH5 $\alpha$ , HB101, or XL1-Blue are used as the host cell, the vector preferably has a promoter, for example, a lacZ promoter (Ward *et al.* (1989) *Nature* 341:544-546; (1992)

FASEB J. 6:2422-2427), araB promoter (Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043), or T7 promoter, to allow efficient expression of the desired gene in *E. coli*. Other examples of the vectors include pGEX-5X-1 (Pharmacia), "QIAexpress system" (QIAGEN), pEGFP, and pET (where BL21, a strain expressing T7 RNA polymerase, is preferably used as the host).

Furthermore, the vector may comprise a signal sequence for polypeptide secretion.

When producing proteins into the periplasm of *E. coli*, the pelB signal sequence (Lei, S. P. *et al.* *J. Bacteriol.* 169:4379 (1987)) may be used as a signal sequence for protein secretion. For example, calcium chloride methods or electroporation methods may be used to introduce the vector into a host cell.

In addition to *E. coli*, expression vectors derived from mammals (e.g., pCDNA3 (Invitrogen), pEGF-BOS (Nucleic Acids Res. (1990) 18(17):5322), pEF, pCDM8), insect cells (e.g., "Bac-to-Bac baculovirus expression system" (GIBCO-BRL), pBacPAK8), plants (e.g., pMH1, pMH2), animal viruses (e.g., pHHSV, pMV, pAdexLcw), retroviruses (e.g., pZIPneo), yeasts (e.g., "Pichia Expression Kit" (Invitrogen), pNV11, SP-Q01), and *Bacillus subtilis* (e.g., pPL608, pKTH50) may also be used as a vector for producing a polypeptide of the present invention.

In order to express proteins in animal cells, such as CHO, COS, and NIH3T3 cells, the vector preferably has a promoter necessary for expression in such cells, for example, an SV40 promoter (Mulligan *et al.* (1979) *Nature* 277:108), MMLV-LTR promoter, EF1 $\alpha$  promoter (Mizushima *et al.* (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:5322), CMV promoter, etc.). It is even more preferable that the vector also carries a marker gene for selecting transformants (for example, a drug-resistance gene enabling selection by a drug such as neomycin or G418). Examples of vectors with such characteristics include pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV, pOP13, and such.

In addition, to stably express a gene and amplify the gene copy number in cells, CHO cells with a defective nucleic acid synthesis pathway can be introduced with a vector containing a DHFR gene (for example, pCHOI) to compensate for the defect, and the copy number may be

amplified using methotrexate (MTX). Alternatively, a COS cell, which carries an SV40 T antigen-expressing gene on its chromosome, can be transformed with a vector containing the SV40 replication origin (for example, pCD) for transient gene expression. The replication origin may be derived from polyoma viruses, adenoviruses, bovine papilloma viruses (BPV), and such. Furthermore, to increase the gene copy number in host cells, the expression vector may contain, as a selection marker, an aminoglycoside transferase (APH) gene, thymidine kinase (TK) gene, *E. coli* xanthine guanine phosphoribosyl transferase (Ecogpt) gene, dihydrofolate reductase (dhfr) gene, and such.

Methods for expressing the DNAs of this invention in the bodies of animals include methods of incorporating the DNAs of this invention into appropriate vectors and introducing them into living bodies by, for example, a retrovirus method, liposome method, cationic liposome method, or adenovirus method. The vectors used include adenovirus vectors (for example, pAdexlcw), and retrovirus vectors (for example, pZIPneo), but are not limited thereto. General genetic manipulations such as inserting the DNAs of this invention into vectors can be performed according to conventional methods (Molecular Cloning, 5.61-5.63). Administration to living bodies can be carried out by *ex vivo* or *in vivo* methods.

Furthermore, the present invention provides host cells into which a vector of this invention is introduced. The host cells into which a vector of this invention is introduced are not particularly limited; for example, *E. coli* and various animal cells are available for this purpose. The host cells of this invention may be used, for example, as production systems to produce and express the antibodies of the present invention. *In vitro* and *in vivo* production systems are available for polypeptide production systems. Production systems that use eukaryotic cells or prokaryotic cells are examples of *in vitro* production systems.

Eukaryotic cells that can be used include, for example, animal cells, plant cells, and fungal cells. Known animal cells include mammalian cells, for example, CHO (J. Exp. Med. (1995)108, 945), COS, 3T3, myeloma, BHK (baby hamster kidney), HeLa, Vero, amphibian cells such as *Xenopus laevis* oocytes (Valle, *et al.* (1981) Nature 291, 358-340), or insect cells (e.g., Sf9, Sf21, and Tn5). CHO cells in which the DHFR gene has been deleted, such as dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) and CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275), are particularly preferable for use as CHO cells. Of the animal cells, CHO cells are particularly favorable for large-scale expression. Vectors can be introduced into a host cell by, for example, calcium phosphate methods, DEAE-dextran methods, methods using cationic liposome DOTAP (Boehringer-Mannheim), electroporation methods, lipofection methods, etc.

Plant cells include, for example, Nicotiana tabacum-derived cells known as polypeptide production systems. Calluses may be cultured from these cells. Known fungal cells include

yeast cells, for example, the genus *Saccharomyces*, such as *Saccharomyces cerevisiae*; and filamentous fungi, for example, the genus *Aspergillus* such as *Aspergillus niger*.

Bacterial cells can be used in prokaryotic production systems. Examples of bacterial cells include *E. coli* (for example, JM109, DH5 $\alpha$ , HB101 and such); and *Bacillus subtilis*.

5       Antibodies can be obtained by transforming the cells with a polynucleotide of interest, then culturing these transformants *in vitro*. Transformants can be cultured using known methods. For example, DMEM, MEM, RPMI 1640, or IMDM may be used as a culture medium for animal cells, and may be used with or without serum supplements such as fetal calf serum (FCS). Serum-free cultures are also acceptable. The preferred pH is about 6 to 8 over 10 the course of culturing. Incubation is typically carried out at about 30 to 40°C for about 15 to 200 hours. Medium is exchanged, aerated, or agitated, as necessary.

15      On the other hand, production systems using animal or plant hosts may be used as systems for producing polypeptides *in vivo*. For example, a DNA of interest may be introduced into an animal or plant, and the polypeptide produced in the body of the animal or plant is then recovered. The "hosts" of the present invention include such animals and plants.

When using animals, there are production systems using mammals or insects. Mammals such as goats, pigs, sheep, mice, and cattle may be used (Vicki Glaser SPECTRUM Biotechnology Applications (1993)). Alternatively, the mammals may be transgenic animals.

20      For example, a DNA of interest may be prepared as a fusion gene with a gene encoding a polypeptide specifically produced in milk, such as the goat  $\beta$ -casein gene. DNA fragments containing the fusion gene are injected into goat embryos, which are then introduced back to female goats. The desired antibody can then be obtained from milk produced by the transgenic goats, which are born from the goats that received the embryos, or from their offspring. Appropriate hormones may be administered to increase the volume of milk containing the 25 polypeptide produced by the transgenic goats (Ebert, K.M. *et al.*, Bio/Technology 12, 699-702 (1994)).

Insects, such as silkworms, may also be used. Baculoviruses carrying a DNA of interest can be used to infect silkworms, and the antibody of interest can be obtained from their body fluids (Susumu, M. *et al.*, Nature 315, 592-594 (1985)).

30      When using plants, tobacco can be used, for example. When tobacco is used, a DNA of interest may be inserted into a plant expression vector, for example, pMON 530, and then the vector may be introduced into a bacterium, such as *Agrobacterium tumefaciens*. The bacteria are then used to infect tobacco, such as *Nicotiana tabacum*, and the desired polypeptides are recovered from the leaves (Julian K.-C. Ma *et al.*, Eur. J. Immunol. 24, 131-138 (1994)).

35      The resulting antibodies of this invention may be isolated from the inside or outside (such as the medium) of host cells, and purified as substantially pure and homogenous antibodies.

Any standard method for isolating and purifying antibodies may be used, and methods are not limited to any specific method. Antibodies may be isolated and purified by selecting an appropriate combination of, for example, chromatographic columns, filtration, ultrafiltration, salting out, solvent precipitation, solvent extraction, distillation, immunoprecipitation,

5 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectric focusing, dialysis, recrystallization, and others.

Chromatography includes, for example, affinity chromatography, ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, gel filtration, reverse-phase chromatography, and adsorption chromatography (*Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). These chromatographies can be carried out using liquid phase chromatographies such as HPLC and FPLC. The present invention also includes antibodies that are highly purified using these purification methods.

In the present invention, the antigen-binding activity of antibodies (*Antibodies: A Laboratory Manual*. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) can be measured using well-known techniques. For example, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), EIA (enzyme immunoassay), RIA (radioimmunoassay), or fluoroimmunoassay may be used.

In the present invention, whether or not the antibodies of this invention induce apoptosis in tumor cells can be determined from whether cell death is induced in Daudi cells or Raji cells, as in the Examples.

Furthermore, the present invention provides apoptosis-inducing agents or antitumor agents that comprise minibodies of this invention as active ingredients. Activities of the minibodies in this invention are considered to have a particularly large effect on lymphoma or leukemic cells, therefore, they are considered to be particularly effective for treatment and prevention of tumors such as cancer (particularly blood tumors). When using anti-CD22 antibodies whose molecular weight has not been reduced as active ingredients, they are preferably cross-linked with an anti-IgG antibody or such.

The above-mentioned antibodies can also be used as conjugate antibodies, after linking to various reagents. Examples of such reagents include chemotherapy reagents, radioactive substances, and toxins. Such conjugate antibodies can be produced by known methods (US 5057313, and US 5156840).

The above-mentioned pharmaceutical agents can be directly administered to patients, or administered as pharmaceutical compositions formulated by known pharmaceutical methods. For example, they may be administered orally, as tablets, capsules, elixirs, or microcapsules, sugar-coated as necessary; or parenterally, in the form of injections of sterile solution or

suspensions prepared with water or other pharmaceutically acceptable liquids. For example, they may be formulated by appropriately combining them with pharmaceutically acceptable carriers or media, more specifically, sterilized water or physiological saline solutions, vegetable oils, emulsifiers, suspending agents, surfactants, stabilizers, flavoring agents, excipients, vehicles, preservatives, binding agents, and such, and mixing them at a unit dosage form required for generally accepted pharmaceutical practice. The amount of active ingredient in the formulation is such that appropriate doses within indicated ranges are achieved.

Additives that can be mixed into tablets and capsules include, for example, binding agents such as gelatin, cornstarch, tragacanth gum, and gum arabic; excipients such as crystalline cellulose; swelling agents such as cornstarch, gelatin, alginic acid; lubricants such as magnesium stearate; sweeteners such as sucrose, lactose, or saccharine; and flavoring agents such as peppermint and *Gaultheria adenothrix* oils, or cherry. When the unit dosage form is a capsule, liquid carriers such as oils and fats can be further included in the above-indicated materials. Sterile compositions to be injected can be formulated using a vehicle such as distilled water for injection, according to standard protocols.

Aqueous solutions for injection include, for example, physiological saline and isotonic solutions comprising glucose or other adjunctive agents such as D-sorbitol, D-mannose, D-mannitol, and sodium chloride. They may also be combined with appropriate solubilizing agents, such as alcohol, and specifically, ethanol, polyalcohol such as propylene glycol or polyethylene glycol, or non-ionic detergent such as polysorbate 80<sup>TM</sup> or HCO-50, as necessary.

Oil solutions include sesame oils and soybean oils, and can be combined with solubilizing agents such as benzyl benzoate or benzyl alcohol. Injection solutions may also be formulated with buffers, for example, phosphate buffers or sodium acetate buffers; analgesics, for example, procaine hydrochloride; stabilizers, for example, benzyl alcohol or phenol; or anti-oxidants. The prepared injections are typically aliquoted into appropriate ampules.

Administration to patients may be performed, for example by intra-arterial injection, intravenous injection, or subcutaneous injection, alternatively by intranasal, transbronchial, intramuscular, transdermal, or oral administration using methods well known to those skilled in the art. Doses vary depending on the body weight and age of the patient, method of administration and such; nevertheless, those skilled in the art can appropriately select suitable doses. Furthermore, if a compound can be encoded by a DNA, the DNA may be incorporated into a gene therapy vector to carry out gene therapy. Doses and administration methods vary depending on the body weight, age, and symptoms of patients, but, again, they can be appropriately selected by those skilled in the art.

A single dose of a pharmaceutical agent of this invention varies depending on the target of administration, the target organ, symptoms, and administration method. However, an

ordinary adult dose (presuming a body weight of 60 kg) in the form of an injection is approximately 0.1 to 1000 mg, preferably approximately 1.0 to 50 mg, and more preferably approximately 1.0 to 20 mg per day, for example.

When administered parenterally, a single dose varies depending on the target of administration, the target organ, symptoms, and administration method, but in the form of an injection, for example, a single dose of approximately 0.01 to 30 mg, preferably approximately 0.1 to 20 mg, and more preferably approximately 0.1 to 10 mg per day may be advantageously administered intravenously to an ordinary adult (presuming a body weight of 60 kg). For other animals, a converted amount based on the amount for a body weight of 60 kg, or a converted amount based on the amount for a body surface area can be administered.

#### Brief Description of the Drawings

Fig. 1 shows the nucleotide sequence and amino acid sequence of an LL2 diabody.

Fig. 2 shows the nucleotide sequence and amino acid sequence of an RFB4 diabody.

Fig. 3 is a set of photographs showing diabody purity. Each of the purified diabodies was subjected to SDS-PAGE analysis, and then analyzed by CBB staining or Western blotting using anti-Flag antibody. As a result, two diabodies were found to be purified, although not completely.

Fig. 4 shows the binding activity of each of the diabodies to Raji cells. The ability of each of the purified diabodies to bind to Raji cells was analyzed. As a result, both diabodies were found to bind to Raji cells. Binding activity was stronger for RFB4 diabody than for LL2 diabody. However, since LL2 antibody is reported to have high activity of internalizing into cells, most of the LL2 diabodies are predicted to have transferred into cells after binding to the cells.

Fig. 5 shows the result of analyzing the cytotoxicity of each diabody. The cytotoxicity of the CD22 diabodies was measured against two types of B-lymphoma cell lines, Daudi and Raji, which are known to strongly express CD22. Each of the diabodies was added to the cells at different concentrations (as indicated in the figure), and 20 hours later, the cells were stained with PI to measure the percentages of dead cells. As a result, both CD22 diabodies were confirmed to induce cell death in B-lymphoma cell lines. These results proved that converted diabodies originated from anti-CD22 antibody can induce cell death in B-lymphoma cell lines by themselves.

#### Best Mode for Carrying Out the Invention

Herein below, the present invention is specifically described using Examples, but it is not to be construed as being limited thereto.

[Example 1] Production of CD22 diabody-expressing vectors

Based on previously known sequence information for two types of anti-CD22 antibodies, specifically LL2 (Patent No. 3053873) and RFB4 (JP 2002501488-A), nucleotide sequences for each of the CD22 diabodies, in which the heavy-chain and light-chain variable regions are linked through a 5-mer linker, were designed (LL2 diabody and RFB4 diabody). Each of the diabody sequences are shown in Fig. 1 (SEQ ID NOs: 1 and 2) and Fig. 2 (SEQ ID NOs: 3 and 4) (linkers are indicated by underlines, and Flag-tags are indicated by wavy lines).

To synthesize cDNAs encoding the designed LL2 diabody and RFB4 diabody, twelve types of oligo-DNAs were produced for each of the diabodies (Espec Oligo Service). The sequences of the synthetic DNAs used are shown in SEQ ID NOs: 13 to 36. cDNAs encoding the diabodies were synthesized as described below. First, two of the oligo-DNAs each were mixed in appropriate combinations. Each mixture was subjected to an annealing and then an elongation reaction in a tube, to produce appropriately 150 bp of DNA fragments. Then, by repeating the recombination reaction several times among the obtained DNA fragments, approximately 800 bp of cDNAs were ultimately synthesized.

Each of the synthesized cDNAs was digested with EcoRI-NotI, and inserted into the EcoRI-NotI gap of the animal cell expression vector, pCXND3. The nucleotide sequences of the vectors were confirmed to complete the construction of an LL2 diabody expression vector (pCXND3-LL2DB) and RFB4 diabody expression vector (pCXND3-RFB4DB).

[Example 2] Purification of CD22 diabodies

(1) Establishment of cell lines expressing LL2 diabody and collection of culture supernatant

20 µg of pCXND3-LL2DB, linearized by cleaving with PvuI, was introduced into DG44 cells by electroporation, as described below. After washing DG44 cells twice with ice-cold PBS, they were suspended in PBS to a density of  $1 \times 10^7$  cells/ml. 20 µg of the above-mentioned plasmid was mixed into the suspension, and subjected to electroporation (1.5 kV, 25 µFD). The cells were appropriately diluted, plated onto a 96-well plate, and cultured in the presence of G418 (GIBCO) at a final concentration of 500 µg/ml. Approximately 30 cell clones were selected from wells in which colonies had grown, and diabody expression levels in the culture supernatants were investigated by Western blotting. Clones showing diabody expression were expanded to use as LL2 diabody-overproducing cell lines. A confluent LL2 diabody-overproducing cell line in a T-175 flask was transferred to two roller bottles (250 ml of CHO-S-SFMII media (GIBCO)), and the culture supernatant was collected five days later. After removing the dead cells by centrifugation, the culture supernatant was passed through a 0.45 µm filter and used for LL2 diabody purification.

(2) Transient expression of RFB4 diabodies in cos7, and collection of culture supernatant

20 µg of pCXND3-RFB4DB was introduced into COS7 cells by an electroporation method, as described below. After washing the COS7 cells twice with ice-cold PBS, they were suspended in PBS to a density of 1x 10<sup>7</sup> cells/ml. 20 µg of the above-mentioned plasmid was mixed into the suspension, and subjected to electroporation (220 V, 950 µFD). Then, all cells were placed in to three T-225 flasks (DMEM + 10% FCS), and the culture supernatant was collected three days later. After removing the dead cells by centrifugation, the culture supernatant was passed through a 0.45 µm filter and used for RFB42 dibody purification.

10

(3) Purification of diabodies

Purification of diabodies was performed as follows: Anti-Flag M2 Agarose (SIGMA) was added to each of the collected culture supernatants, and mixed overnight at 4°C to adhere the diabodies. Anti-Flag M2 Agarose was collected by centrifugation, and washed several times with PBS, and then the diabodies were eluted using an elution buffer (100 mM Glycine pH3.5, 0.01% Tween 20). The collected samples were immediately neutralized with Tris-HCl (pH8.0) such that the final concentration was 25 mM. The samples were then concentrated, and the buffer was changed to PBS containing 0.01% of Tween 20. A portion of the collected samples was subjected to SDS electrophoresis, and then Western blotting using the anti-FLAG antibody and Coomassie staining were carried out to confirm that the target protein was purified.

[Example 3] Confirmation of binding of CD22 diabodies to lymphoma cells

Purified LL2 diobody and RFB4 diobody were added to cells of the B-lymphoma cell line, Raji, in PBS containing 2% FCS and 0.02% NaN<sub>3</sub> such that the final concentrations were 20 µg/mL and 8 µg/mL, respectively. After reacting on ice for one hour, anti-Flag M2 antibody was added to the mixture, and then reacted on ice for another one hour. The cells were washed and reacted with FITC-anti-mouse IgG on ice for 30 minutes. Diabody binding to the cell surface was measured by flow cytometry (EPICS ELITE, COULTER).

30

[Example 4] Analysis of the lymphoma cell death-inducing activities of CD22 diabodies

B-lymphoma cell lines, Raji and Daudi, were plated onto 24-well plates at a density of 2x - 5x 10<sup>5</sup> cells/well. Purified LL2 diobody or RFB4 diobody were added to each of the wells, which were then cultured at 37°C. The cells were collected 20 hours later, and dead cells were labeled by adding PI and then reacted at room temperature for 15 minutes. Thereafter, the percentage of stained dead cells was measured by flow cytometry (EPICS ELITE, COULTER).

35

Industrial Applicability

This invention provides minibodies with high specific activities. By using these minibodies, adequate drug efficacy can be expected even with a short half-life. The minibodies of the present invention are further expected to be able to separate drug efficacy from toxicity.

- 5 In addition, since overall cost is reduced, including reducing clinical dose and production cost, economical problems of concern in the development of antibody pharmaceuticals are also expected to improve.

## CLAIMS

1. A minibody that recognizes CD22.
- 5 2. The minibody of claim 1, wherein the minibody is a diabody.
3. A minibody of any one of (a) to (f):
  - (a) a minibody comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 or 3;
  - (b) a minibody functionally equivalent to the minibody of (a), and comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 or 3 wherein one or more amino acids are substituted, inserted, deleted, and/or added;
  - 10 (c) a minibody comprising the amino acid sequences of a CDR of SEQ ID NOs: 5 and 7;
  - (d) a minibody functionally equivalent to the minibody of (c), and comprising the amino acid sequence of a CDR of SEQ ID NOs: 5 and 7 wherein one or more amino acids are substituted, inserted, deleted, and/or added;
  - 15 (e) a minibody comprising the amino acid sequences of a CDR of SEQ ID NOs: 9 and 11; and
  - (f) a minibody functionally equivalent to the minibody of (c), and comprising the amino acid sequence of a CDR of SEQ ID NOs: 9 and 11 wherein one or more amino acids are substituted, inserted, deleted, and/or added.
- 20 4. A method for producing a CD22-recognizing antibody with increased activity by converting a CD22-recognizing antibody to a low-molecular-weight antibody.
- 25 5. The method of claim 4, wherein the conversion is conversion to a diabody.
6. The method of claim 4 or 5, wherein the activity is an apoptosis-inducing activity.
- 30 7. An apoptosis-inducing agent comprising the minibody of any one of claims 1 to 3, or the minibody produced by the method of any one of claims 4 to 6, as an active ingredient.
8. The apoptosis-inducing agent of claim 7 that induces tumor cell apoptosis.
- 35 9. The apoptosis-inducing agent of claim 8, wherein the tumor cell is a lymphoma or leukemic cell.

10. An antitumor agent comprising the minibody of any one of claims 1 to 3, or the minibody produced by the method of any one of claims 4 to 6, as an active ingredient.
- 5    11. The antitumor agent of claim 10, wherein the tumor is a blood tumor.
12. The apoptosis-inducing agent of any one of claims 7 to 9, wherein the antibody is a diabody.
- 10    13. The antitumor agent of claim 10 or 11, wherein the antibody is a diabody.

## ABSTRACT

CD22 diabodies, in which heavy-chain and light-chain variable regions are linked by a 5-mer linker, were produced based on known sequence information for two types of anti-CD22 antibodies. The two diabodies produced were analyzed for their activity of binding to lymphoma cells and inducing lymphoma cell death (apoptosis). As a result, both diabodies were revealed to bind to the B-lymphoma cell line, "Raji", and to have apoptosis-inducing activity towards Raji cells as well as towards another B-lymphoma cell line: Daudi cells. These results show that minibodies of antibodies that recognize CD22 can be used as apoptosis-inducing agents for tumor cells such as lymphoma cells.

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局



(43)国際公開日  
2004年10月14日 (14.10.2004)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 2004/087763 A1

- (51)国際特許分類7:  
C07K 16/28,  
C12N 15/62, A61K 39/395, A61P 1/04, 1/16, 3/10, 5/14,  
7/00, 7/04, 7/06, 11/06, 15/08, 17/00, 17/06, 21/04, 25/00,  
27/02, 29/00, 35/00, 35/02, 37/02, 43/00
- (21)国際出願番号:  
PCT/JP2004/004696
- (22)国際出願日:  
2004年3月31日 (31.03.2004)
- (25)国際出願の言語:  
日本語
- (26)国際公開の言語:  
日本語
- (30)優先権データ:  
特願2003-096950 2003年3月31日 (31.03.2003) JP
- (71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72)発明者; および  
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 土屋政幸 (TSUCHIYA, Masayuki) [JP/JP]; 〒4120038 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 木村直紀 (KIMURA, Naoki) [JP/JP]; 〒3004101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 中外製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 福田達也 (FUKUDA, Tatsuya) [JP/JP]; 〒4120038 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).
- (74)代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsuhi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84)指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54)Title: MODIFIED ANTIBODY AGAINST CD22 AND UTILIZATION THEREOF

(54)発明の名称: CD 22に対する改変抗体およびその利用

(57)Abstract: Based on the sequential data of two anti-CD22 antibodies having been published, CD22 diabodies in which variable regions of the heavy chain and the light chain are bonded together via a 5mer linker are constructed. These 2 diabodies are examined in binding to lymphoma cells and activity of inducing cell death (apoptosis). As a result, it is found out that both of these diabodies bind to a Raji cell (i.e., a B lymphoma cell line) and have an activity of inducing apoptosis in the Raji cell and a Daudi cell which is also a B lymphoma cell line. These results indicate that degraded antibodies recognizing CD22 are usable as apoptosis inducers in tumor cells such as lymphocyte cells.

(57)要約: 既に公開されている二種類の抗CD22抗体の配列情報をもとに、重鎖と軽鎖の可変領域を5merのリンカーで連結させたCD22diobodyをそれぞれ作製した。作製した2種のdiobodyについて、リンパ腫細胞に対する結合及び細胞死(アポトーシス)誘導活性の検討を行った結果、これらdiobodyがいずれもBリンパ腫細胞株であるRaji細胞に結合し、さらに、いずれもRaji細胞および同じくBリンパ腫細胞株であるDaudi細胞にアポトーシスを誘導する活性があることが判明した。以上の結果は、CD22を認識する抗体の低分子化抗体がリンパ腫細胞などの腫瘍細胞に対するアポトーシス誘導剤として利用できることを示している。

WO 2004/087763 A1

- 1 -

## 明細書

### CD 22に対する改変抗体およびその利用

#### 5 技術分野

本発明は、CD22を認識する抗体の低分子化抗体に関する。

#### 背景技術

CD22は、Igスーパーファミリーに属する分子であり、その発現はB細胞に特異的で、B細胞レセプターからのシグナルを抑制する機能を担っていると考えられている。また、CD22は、造血器疾患において、様々なB細胞性白血病、悪性リンパ腫細胞に発現していることが知られている。血清中に可溶性のCD22は検出されていないことから、CD22は抗体療法が可能であると考えられている（非特許文献1から5）。

造血器腫瘍におけるCD22抗体の利用に関しては、ヒト化された抗CD22抗体などを利用してB細胞悪性疾患の治療が可能である旨の報告がある（特許文献1および2）。しかしながら、これら文献においては、抗CD22抗体とアポトーシス誘起活性との関係については、何ら開示されていない。

一方、通常の抗CD22抗体では認められなかったリンパ腫細胞株であるDaudiに対する増殖抑制効果が、抗CD22抗体を架橋剤で化学的にcross-linkすることで、認められたとの報告がある（非特許文献6）。ただし、アポトーシス誘導に関する記述はなされていない。

実際の治療において種々の利点を有する低分子化された抗体の利用に関しては、CD22を含む数種の抗原に対する抗体（IgG、Fc部分を含まないFab'2）をクロスリンクし、これを用いて腫瘍細胞のアポトーシスを誘起する方法が開示されている（特許文献3）。しかしながら、この文献においては、CD22に対する抗体は、実

- 2 -

際に作成されておらず、従って、そのアポトーシス誘起活性の検出も行われていない。

このように低分子化された抗CD22抗体を利用して腫瘍細胞のアポトーシスを誘導したとの報告はいまだなされていない。

5 なお、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

[非特許文献 1] 西井一浩 CURRENT RHERAPY Vol. 20 No. 1 47-50

[非特許文献 2] Tedder et al., Ann Rev Immunol 15:481-504(1997)

[非特許文献 3] Clark EA J Immunol 150:4715-4718(1993)

[非特許文献 4] Sato et al., Immunity 5:551-562(1996)

10 [非特許文献 5] Li et al., Cell Immunol 118:85-99(1993)

[非特許文献 6] Ghetie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7509-7514 (1997)

[特許文献 1] 特表2001-518930

[特許文献 2] 特表平10-505231

15 [特許文献 3] WO99/02567

### 発明の開示

そこで、本発明の第一の目的は、CD22を認識する抗体の低分子化抗体を提供することにある。本発明のさらなる目的は、この低分子化抗体を利用した新たな造20 血器腫瘍の治療法を提供することにある。

本発明者らは、CD22に対する低分子化抗体であるdiabodyを作製することを目的として、まず、既に公開されている二種類の抗CD22抗体の配列情報をもとに、重鎖と軽鎖の可変領域を5merのリンカーで連結させたCD22diabodyの塩基配列をそれぞれ設計し、その合成を行った（精製の容易化のためdiabodyにはFlag-tagを挿入25 した）。合成したcDNAを動物細胞発現ベクターに挿入し、これをDG44細胞あるいはCOS7細胞に導入し、その培養上清から、生産されたdiabodyを抗Flag M2アガロ

- 3 -

ースを利用してアフィニティー精製した。

本発明者らは、次いで、こうして得られた2種のdiabodyについて、リンパ腫細胞に対する結合及び細胞死（アポトーシス）誘導活性の検討を行った。その結果、これらdiabodyがいずれもBリンパ腫細胞株であるRaji細胞に結合し、さらに、い

5 ずれもRaji細胞および同じくBリンパ腫細胞株であるDaudi細胞にアポトーシスを誘導する活性があることが判明した。以上の結果は、CD22を認識する抗体の低分子化抗体がリンパ腫細胞などの腫瘍細胞に対するアポトーシス誘導剤として利用できることを示している。

即ち、本発明は、以下の（1）～（12）を提供するものである。

- 10 (1) CD22を認識する低分子化抗体。
- (2) Diabodyである（1）に記載の低分子化抗体。
- (3) 以下の（a）～（f）のいずれかに記載の低分子化抗体。
- (a) 配列番号：1または3に記載のアミノ酸配列を有する低分子化抗体。
- 15 (b) 配列番号：1または3に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する低分子化抗体であって、（a）に記載の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。
- (c) 配列番号：5のCDRおよび配列番号：7のCDRのアミノ酸配列を有する低分子化抗体。
- 20 (d) 配列番号：5のCDRおよび配列番号：7のCDRのアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する低分子化抗体であって、（c）に記載の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。
- (e) 配列番号：9のCDRおよび配列番号：11のCDRのアミノ酸配列を有する低分子化抗体。

- 4 -

(f) 配列番号：9のCDRおよび配列番号：11のCDRのアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有する低分子化抗体であって、  
(c) に記載の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。

5 (4) CD22を認識する抗体を低分子化することによって、活性が上昇した抗体を製造する方法。

(5) 低分子化がDiabody化である、(4)に記載の方法。

(6) 活性がアポトーシス誘導活性である、(4)または(5)に記載の方  
法。

10 (7) (1)～(3)のいずれかに記載の低分子化抗体、(4)～(6)の  
いずれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体を有効成分とし  
て含有する、アポトーシス誘導剤。

(8) 腫瘍細胞に対するアポトーシスを誘導する、(7)に記載のアポト  
ーシス誘導剤。

15 (9) 腫瘍細胞がリンパ腫細胞または白血病細胞である、(8)に記載のア  
ポトーシス誘導剤。

(10) (1)～(3)のいずれかに記載の低分子化抗体、(4)～(6)  
のいずれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体を有効成分  
として含有する、抗腫瘍剤。

20 (11) 腫瘍が血液腫瘍である、(10)に記載の抗腫瘍剤。

(12) 抗体がDiabodyである、(7)から(9)のいずれかに記載のアポト  
ーシス誘導剤。

(13) 抗体がDiabodyである、(10)または(11)に記載の抗腫瘍剤。

本発明は、CD22を認識する低分子化抗体を提供する。本発明における低分子化  
25 抗体は、活性が上昇している点で有用である。ここで、活性とは、抗体が抗原に  
結合することにより生じる生物学的作用をいう。具体的な例としては、アポト

シス誘導作用、抗腫瘍作用である。

アポトーシス誘導作用、抗腫瘍作用などの対象となる細胞は特に限定されないが、腫瘍細胞が好ましい。腫瘍細胞の具体的な例としては、リンパ腫細胞や白血病細胞が最も好ましい。

- 5 本発明においては、上記CD22を認識する低分子化抗体を投与することにより、  
例えば、血液腫瘍などの腫瘍（具体的な例として、白血病、骨髓異形成症候群、  
悪性リンパ腫、慢性骨髄性白血病、形質細胞異常症（多発性骨髄腫、マクログロ  
ブリン血症）、骨髄増殖性疾患（真性赤血球增加症、本態性血小板血症、特発性  
骨髄纖維症）など）や自己免疫疾患（具体的な例として、リウマチ、自己免疫性  
10 肝炎、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性水疱症、自己免疫性副腎皮質炎、自己  
免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性萎縮性胃炎、自己  
免疫性好中球減少症、自己免疫性精巣炎、自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫性レセ  
プター病、自己免疫不妊、クローン病、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、  
バセドウ病、若年性糖尿病、アジソン病、重症筋無力症、水晶体型ブドウ膜炎、  
15 乾癬、ベーチェット病、など）のような疾患の治療、予防などをおこなうことが  
可能である。

本発明において、CD22とは、Igスーパーファミリーに属し、7個のIg様ドメイン  
からなり、遺伝子上19q13.1に存在する分子（Tedder et al., Ann Rev Immunol 1  
5:481-504(1997)）を意味する。

- 20 本発明において低分子化抗体とは、全長抗体（whole antibody、例えばwhole Ig  
G等）の一部分が欠損している抗体断片を含み、抗原への結合能を有していれば特  
に限定されない。本発明の抗体断片は、全長抗体の一部分であれば特に限定され  
ないが、重鎖可変領域（VH）又は軽鎖可変領域（VL）を含んでいいことが好まし  
く、特に好ましいのはVHとVLの両方を含む断片である。抗体断片の具体例として  
25 は、例えば、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、scFv（シングルチェインFv）、などを  
挙げることができるが、好ましくはscFv（Huston, J. S. et al., Proc. Natl. A

- 6 -

cad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883、Pluckthun 「The Pharmacology of Monoclonal Antibodies」 Vol. 113, Resenburg 及び Moore編, Springer Verlag, New York, pp. 269-315, (1994))である。このような抗体断片を得るには、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンなどで処理し抗体断片を生成させるか、又は、

- 5 これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、  
適当な宿主細胞で発現させればよい（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol.  
(1994) 152, 2968-2976；Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol.  
(1989) 178, 476-496；Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515；Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663；Rous  
10 seaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669；Bird, R. E. and  
Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照）。

本発明における低分子化抗体は、全長抗体よりも分子量が小さくなることが好ましいが、例えば、ダイマー、トリマー、テトラマーなどの多量体を形成すること等もあり、全長抗体よりも分子量が大きくなることもある。

- 15 本発明において好ましい低分子化抗体は、抗体のVHを2つ以上及びVLを2つ以上含み、これら各可変領域を直接あるいはリンカー等を介して間接的に結合した抗体である。結合は、共有結合でも非共有結合でもよく、また、共有結合と非共有結合の両方でよい。さらに好ましい低分子化抗体は、VHとVLが非共有結合により結合して形成されるVH-VL対を2つ以上含んでいる抗体である。この場合、低分子化抗体中的一方のVH-VL対と他方のVH-VL対との間の距離が、全長抗体における距離よりも短くなる抗体が好ましい。

- 本発明において特に好ましい低分子化抗体はDiabodyである。Diabodyは、可変領域と可変領域をリンカー等で結合したフラグメント（例えば、scFv等）（以下、Diabodyを構成するフラグメント）を2つ結合させて二量体化させたものであり、  
25 通常、2つのVLと2つのVHを含む（P. Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6444-6448 (1993)、EP404097号、W093/11161号、Johnson et al., Method in

- 7 -

Enzymology, 203, 88-98, (1991)、Holliger et al., Protein Engineering, 9, 299-305, (1996)、Perisic et al., Structure, 2, 1217-1226, (1994)、John et al., Protein Engineering, 12(7), 597-604, (1999)、Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90, 6444-6448, (1993)、Atwell et al., Mol. Immunol. 33,

5 Diabodyを構成するフラグメント間の結合は非共有結合でも、共有結合でよいが、好ましくは非共有結合である。

また、Diabodyを構成するフラグメント同士をリンカーなどで結合して、一本鎖 Diabody (scDiabody) とすることも可能である。その際、Diabodyを構成するフラグメント同士を20アミノ酸程度の長いリンカーを用いて結合すると、同一鎖上に 10 存在するDiabodyを構成するフラグメント同士で非共有結合が可能となり、二量体を形成する。

Diabodyを構成するフラグメントは、VLとVHを結合したもの、VLとVLを結合したもの、VHとVHを結合したもの等を挙げることができるが、好ましくはVHとVLを結合したものである。Diabodyを構成するフラグメント中において、可変領域と可変領域を結合するリンカーは特に制限されないが、同一フラグメント中の可変領域の間で非共有結合がおこらない程度に短いリンカーを用いることが好ましい。そのようなリンカーの長さは当業者が適宜決定することができるが、通常 2 ~ 14 アミノ酸、好ましくは 3 ~ 9 アミノ酸、特に好ましくは 4 ~ 6 アミノ酸である。

この場合、同一フラグメント上にコードされるVLとVHとは、その間のリンカーが 20 短いため、同一鎖上のVLとVHの間で非共有結合がおこらず、単鎖V領域フラグメントが形成されない為、他のフラグメントとの非共有結合による二量体を形成する。さらに、Diabody作製と同じ原理で、Diabodyを構成するフラグメントを3つ以上結合させて、トリマー、テトラマーなどの多量体化させた抗体を作製することも可能である。

25 本発明におけるDiabodyとしては、下記のものを例示できるが、これらに限定されるものではない。

- 8 -

1. 配列番号：1または3に記載のアミノ酸配列を有するDiabody
  2. 配列番号：1または3に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が変異（置換、欠失、挿入、および／または付加）したアミノ酸配列を有するDiabodyであって、配列番号：1または3に記載の配列を有するDiabodyと機能的に同等なDiabody
  3. 配列番号：5のCDR（又は可変領域）および配列番号：7のCDR（又は可変領域）のアミノ酸配列を有するDiabody
  4. 配列番号：5のCDR（又は可変領域）および配列番号：7のCDR（又は可変領域）のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が変異（置換、欠失、挿入、および／または付加）したアミノ酸配列を有するDiabodyであって、配列番号：5のCDR（又は可変領域）および配列番号：7のCDR（又は可変領域）の配列を有するDiabodyと機能的に同等なDiabody
  5. 配列番号：9のCDR（又は可変領域）および配列番号：11のCDR（又は可変領域）のアミノ酸配列を有するDiabody
  6. 配列番号：9のCDR（又は可変領域）および配列番号：11のCDR（又は可変領域）のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が変異（置換、欠失、挿入、および／または付加）したアミノ酸配列を有するDiabodyであって、配列番号：9のCDR（又は可変領域）および配列番号：11のCDR（又は可変領域）の配列を有するDiabodyと機能的に同等なDiabody
- ここで「機能的に同等」とは、対象となるDiabodyが、配列番号：1または3に記載の配列を有するDiabody、配列番号：5のCDR（又は可変領域）および配列番号：7のCDR（又は可変領域）の配列を有するDiabody、または、配列番号：9のCDR（又は可変領域）および配列番号：11のCDR（又は可変領域）の配列を有するDiabodyと同等の活性（例えば、CD22への結合活性、アポトーシス誘導活性など）を有することを意味する。
- 変異するアミノ酸数は特に制限されないが、通常、30アミノ酸以内であり、好

- 9 -

ましくは15アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内（例えば、3アミノ酸以内）であると考えられる。変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸（A、I、L、M、F、P、W、Y、V）、親水性アミノ酸（R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T）、脂肪族側鎖を有するアミノ酸（G、A、V、L、I、P）、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸（S、T、Y）、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸（C、M）、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸（D、N、E、Q）、塩基含有側鎖を有するアミノ酸（R、K、H）、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸（H、F、Y、W）を挙げることができる（括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す）。あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている（Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413）。

また、配列番号：1または3に記載のアミノ酸配列を有するDiabody、配列番号：5のCDR（又は可変領域）および配列番号：7のCDR（又は可変領域）の配列を有するDiabody、または配列番号：9のCDR（又は可変領域）および配列番号：11のCDR（又は可変領域）の配列を有するDiabodyを、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的としてヒト型化、キメラ化してもよい。

配列番号：5に記載されている可変領域に相当するアミノ酸配列で、31～35がCDR1、50～66がCDR2、99～105がCDR3に相当する。配列番号：7に記載されている可変領域に相当するアミノ酸配列で、24～40がCDR1、56～62がCDR2、95～103がCDR3に相当する。配列番号：9に記載されている可変領域に相当するアミノ酸配列で、31～35がCDR1、50～66がCDR2、99

- 10 -

～112がCDR3に相当する。配列番号：11に記載されている可変領域に相当するアミノ酸配列で、24～34がCDR1、50～56がCDR2、89～97がCDR3に相当する。

- 本発明においてCD22を認識する低分子化抗体は、CD22に特異的に結合し、生物  
5 学的作用を有していれば特に制限されない。本発明の低分子化抗体は、当業者に  
公知の方法により作製することが可能である。例えば、実施例に記載されている  
ように、CD22を認識する抗体の配列（特に可変領域の配列や相補鎖決定領域（CD  
R）の配列）を基に、当業者に公知の遺伝子組換え技術を用いて作製することが可  
能である。
- 10 CD22を認識する抗体の配列は、既に公知の抗体の配列を用いることが可能であ  
り、又、CD22を抗原として、当業者に公知の方法により抗CD22抗体を作製し、そ  
の抗体の配列を取得して用いることも可能である。具体的には、例えば、以下の一  
ようにして行うことができる。CD22タンパク質若しくはその断片を感作抗原とし  
て使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通  
常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法によ  
り、モノクローナルな抗体産生細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングする。  
抗原の調製は公知の方法、例えばバキュロウイルスを用いた方法（W098/46777な  
ど）等に準じて行うことができる。ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルス  
ティンらの方法（Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73:  
15 3-46）等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミ  
ン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。その後、ハイ  
ブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V領域）のcDNAを合成  
20 し、得られたcDNAの配列を公知の方法により解読すればよい。
- CD22を認識する抗体は、CD22と結合する限り特に制限はなく、マウス抗体、ラ  
25 ット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、ヒト抗体等を適宜用いることができる。又、  
ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝

- 11 -

子組換え型抗体、例えば、キメラ (Chimeric) 抗体、ヒト型化 (Humanized) 抗体なども使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体等であり、マウス抗体

- 5 の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し產生させることにより得ることができる。

ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining

- 10 region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region ; FR) を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し產生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96 /02576参照）。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

これらキメラ抗体やヒト型化抗体などについては、低分子化した後にキメラ化やヒト型化等を行ってもよいし、キメラ化やヒト型化等を行った後に低分子化を行ってもよい。

- 25 また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球を *in vitro* で所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミ

- 12 -

- エローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878参照）。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる（国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照）。
- 5 さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を挿入した適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらのこと方法は既に周知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388を参考にすることができる。
- 10 15 本発明の抗体は、ポリエチレンギリコール（PEG）、放射性物質、トキシン等の各種分子と結合したコンジュゲート抗体でもよい。このようなコンジュゲート抗体は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。本発明における「抗体」にはこれらのコンジュゲート抗体も含まれる。
- 20 25 本発明は、本発明の抗体をコードするDNAを包含する。又、該DNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、抗原への結合能及び活性を有する抗体をコードするDNAを包含する。ハイブリダイゼーション技術(Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9. 47-9. 58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989)は当業者に公知であり、ハイブリダイゼーションの条件は、当業者であれば適宜選択することができる。ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、低ストリンジエントな条件が挙げられる。低ストリンジエントな条件とは、ハイブリダ

- 13 -

イゼーション後の洗浄において、例えば42°C、0.1×SSC、0.1%SDSの条件であり、好ましくは50°C、0.1×SSC、0.1%SDSの条件である。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジエントな条件が挙げられる。高ストリンジエントな条件とは、例えば65°C、5×SSC及び0.1%SDSの条件である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同意性を有するDNAが効率的に得られることが期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

10 本発明のDNAは、本発明の抗体の*in vivo*や*in vitro*における生産に利用される他、例えば、遺伝子治療などへの応用も考えられる。本発明のDNAは、本発明の抗体をコードしうるものであればいかなる形態でもよい。即ち、mRNAから合成されたcDNAであるか、ゲノムDNAであるか、化学合成DNAであるかなどを問わない。また、本発明の抗体をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列15 を有するDNAが含まれる。

本発明の抗体は当業者に公知の方法により製造することができる。具体的には、目的とする抗体のDNAを発現ベクターへ組み込む。その際、発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させること20 ができる。その際には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。

ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げら25 れる。

本発明の抗体を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発

現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5 $\alpha$ 、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター (Wardら, Nature (1989) 341, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) 、araBプロモーター (Betterら, Science (1988) 240, 1041-1043 ) 、またはT7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1 (ファルマシア社製) 、「QIAexpress system」 (キアゲン社製) 、pEGFP、またはpET(この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい)などが挙げられる。

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。ポリペプチド分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379 ) を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

大腸菌以外にも、例えば、本発明のポリペプチドを製造するためのベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター (例えば、pcDNA3 (インビトロゲン社製) や、pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p5322) 、pEF、pCDM8) 、昆虫細胞由来の発現ベクター (例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」 (ギブコBRL社製) 、pBacPAK8) 、植物由来の発現ベクター (例えばpMH1、pMH2) 、動物ウィルス由来の発現ベクター (例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw) 、レトロウィルス由来の発現ベクター (例えば、pZIPneo) 、酵母由来の発現ベクター (例えば、「Pichia Expression Kit」 (インビトロゲン社製) 、pNV11、SP-Q01) 、枯草菌由来の発現ベクター (例えば、pPL608、pKTH50) が挙げられる。

CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター (Mulli

- 15 -

ganら, Nature (1979) 277, 108) 、MMLV-LTRプロモーター、EF1 $\alpha$ プロモーター (Mizushimaら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) 、CMVプロモーターなどを持つていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子 (例えば、薬剤 (ネオマイシン、G418など) により判別できるような薬剤耐性遺伝子) を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR 遺伝子を有するベクター (例えば、pCHOIなど) を導入し、メトトレキセート (MT X) により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター (pcDなど) で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアミニンホスホシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

一方、動物の生体内で本発明のDNAを発現させる方法としては、本発明のDNAを適当なベクターに組み込み、例えば、レトロウイルス法、リポソーム法、カチオニックリポソーム法、アデノウィルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。用いられるベクターとしては、例えば、アデノウィルスベクター (例えばpAdexlcw) やレトロウイルスベクター (例えばpZIPneo) などが挙げられるが、これらに制限されない。ベクターへの本発明のDNAの挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である (Molecular Cloning , 5. 61-5. 63) 。生体内への投与は、*ex vivo*法であっても、*in vivo*法であってもよい。

また、本発明は、本発明のベクターが導入された宿主細胞を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。本発明の宿主細胞は、例えば、本発明の抗体の製造や発現のための產生系として使用することができる。ポリペ

- 5 プチド製造のための產生系は、*in vitro*および*in vivo*の產生系がある。*in vitro*の產生系としては、真核細胞を使用する產生系や原核細胞を使用する產生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO (*J. Exp. Med.*

- 10 (1995) 108, 945) 、 COS、 3T3、 ミエローマ、 BHK (baby hamster kidney) 、 HeLa、 Vero、 両生類細胞、 例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., *Nature* (1981) 291, 358-340) 、あるいは昆虫細胞、 例えば、 Sf9、 Sf21、 Tn5が知られている。CHO細胞としては、特に、 DHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) やCHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、 例えば、 リン酸カルシウム法、 DEAEデキストラン法、 カチオニッククリボソームDOTAP (ベーリンガーマンハイム社製) を用いた方法、 エレクトロポーレーション法、 リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

- 20 植物細胞としては、 例えば、 ニコチアナ・タバコ (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞がポリペプチド生産系として知られており、 これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、 酵母、 例えば、 サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、 例えば、 サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 、 糸状菌、 例えば、 アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、 例えば、 アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

原核細胞を使用する場合、 細菌細胞を用いる產生系がある。細菌細胞としては、

- 17 -

大腸菌 (*E. coli*) 、例えば、JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101等が挙げられ、その他、枯草  
歯が知られている。

これらの細胞を目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro*  
で培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行なうことが

5 できる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM  
を使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用するこ  
ともできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは、約6~8であるのが好まし  
い。培養は、通常、約30~40°Cで約15~200時間行い、必要に応じて培地の交換、  
通気、攪拌を加える。

10 一方、*in vivo*でポリペプチドを產生させる系としては、例えば、動物を使用す  
る產生系や植物を使用する產生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的と  
するDNAを導入し、動物又は植物の体内でポリペプチドを產生させ、回収する。本  
発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

15 動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる產生系がある。哺乳類動物と  
しては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glase  
r, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる  
場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

20 例えば、目的とするDNAを、ヤギ $\beta$ カゼインのような乳汁中に固有に產生される  
ポリペプチドをコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この  
融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚  
を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が产生する乳  
汁から、目的の抗体を得ることができる。トランスジェニックヤギから產生され  
るポリペプチドを含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェ  
ニックヤギに使用してもよい (Ebert, K. M. et al., Bio/Technology (1994) 12,  
25 699-702)。

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場

- 18 -

合、目的のDNAを挿入したバキュロウイルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的のポリペプチドを得ることができる (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを  
5 用いる場合、目的のDNAを植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベ  
クターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*)  
のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチア  
ナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペ  
チドを得ることができる (Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994)  
10 24, 131-138)。

これにより得られた本発明の抗体は、宿主細胞内または細胞外（培地など）か  
ら単離し、実質的に純粋で均一な抗体として精製することができる。抗体の分離、  
精製は、通常の抗体の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、  
何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、  
15 限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミ  
ドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれ  
ば抗体を分離、精製することができる。

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティーコロマトグラフィー、イ  
オン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロ  
20 マトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Prot  
ein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これ  
らのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液  
相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法  
25 を用い、高度に精製された抗体も包含する。

本発明において、抗体の抗原結合活性 (Antibodies A Laboratory Manual. Ed H

- 1 9 -

arlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) の測定には公知の手段を使用することができる。例えば、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法) 、EIA (酵素免疫測定法) 、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光免疫法などを用いることができる。

5 本発明において、本発明の抗体が腫瘍細胞に対してアポトーシスを誘導するか否かは、実施例と同様にしてDaudi細胞又はRaji細胞に対して細胞死を誘導するか否かにより判定することができる。

また、本発明は、本発明の低分子化抗体を有効成分として含有する、アポトーシス誘導剤または抗腫瘍剤を提供する。本発明の低分子化抗体のこれら活性は、  
10 リンパ腫細胞または白血病細胞で特に効果が大きいと考えられるので、癌などの腫瘍（特に血液腫瘍）の治療や予防に特に有効であると考えられる。低分子化されていない抗CD22抗体を有効成分として用いる場合には、抗IgG抗体などでクロスリンクすることが好ましい。

上記抗体には各種試薬を結合してコンジュゲート抗体として使用することもできる。このような試薬としては、化学療法剤、放射性物質、トキシンなどを挙げ  
15 ことができる。このようなコンジュゲート抗体は公知の方法により作製することができる (US5057313、US5156840) 。

上記薬剤は、直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与を行うことも可能である。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合  
20 わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示され  
25

- 20 -

た範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

- 錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターク、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターク、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、
- 5 ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。
- 10 注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80 (TM) 、HCO-50と併用してもよい。
- 15 油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。
- 20 患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組込み、
- 25 遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

- 21 -

本発明の薬剤の投与量は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から1000mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgであると考えられる。

- 5 非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、通常、1日当たり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合であると考えられる。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量、あるいは体表面積あたりに換算した量を投与することができる。
- 10

#### 図面の簡単な説明

図1は、LL2diabodyの塩基配列およびアミノ酸配列を示す図である。

図2は、RFB4diabodyの塩基配列およびアミノ酸配列を示す図である。

- 15 図3は、diabodyの精製を示す写真である。精製した各diabodyをSDS-PAGEし、CBB染色、または、抗Flag抗体でウエスタンプロットを行った。その結果、いずれのdiabodyも完全ではないがほぼ精製されていることが確認された。

- 図4は、各diabodyのRaji細胞への結合能の確認を示す図である。精製した各diabodyの、Raji細胞への結合能について解析を行った。その結果、いずれのdiabodyもRaji細胞へ結合することが確認された。結合活性はLL2diabodyよりもRFB4diabodyの方が強かった。ただしLL2抗体は細胞内へのinternalize活性が高いことが報告されているため、多くのLL2diabodyは細胞に結合後、細胞内に取り込まれてしまっている可能性が予想される。
- 20

- 図5は、各diabodyによる細胞傷害活性の解析を示す図である。CD22を高度に発現することが知られている2種類のBリンパ腫細胞株、Daudi、Rajiに対するCD22diabodyの細胞傷害活性を測定した。それぞれのdiabodyを各濃度（図中に示す）で
- 25

- 22 -

細胞に添加し、20時間後に細胞をPIで染色することで、死細胞の割合を測定した。その結果、いずれのCD22diabodyもBリンパ腫細胞株に対して、細胞死を誘導していることが確認された。この結果より、diabody化した抗CD22抗体が、単独でBリンパ腫細胞株に対して細胞死を誘導できることが証明された。

5

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

##### [実施例 1] CD22diabody発現ベクターの作製

10 既に公開されている二種類の抗CD22抗体、すなわちLL2（特許第3053873号）、RFB4（JP 2002501488-A）の配列情報をもとに、重鎖と軽鎖の可変領域を5merのリンカーで連結させたCD22diabodyの塩基配列をそれぞれ設計した。（LL2diabody、RFB4diabody）。図1（配列番号：1、2）および図2（配列番号：3、4）に、それぞれのdiabodyの配列を示す（リンカーをアンダーライン、Flag-tagを波線で示す）。

設計したLL2diabody、及び、RFB4diabodyをコードするcDNAを合成するため、各diabodyにつきそれぞれ12種類ずつオリゴDNAを作製した（エスペックオリゴサービス株式会社）。配列番号：13から36に使用した合成DNAの配列を示す。

20 DiabodyをコードするcDNAは以下のとおりに合成した。まず、各オリゴDNA2本ずつを適切な組み合わせで混合しそれぞれをチューブ内でアニール、および伸長反応させることで、150bp程度のDNA断片を作製した。繰り返すことで、最終的に約800bpからなるcDNAの合成を行った。

25 合成して得られた各cDNAをEcoRI-NotI切断し、動物細胞発現ベクターpCXND3のEcoRI-NotI間に挿入した。塩基配列を確認し、LL2diabody発現ベクター（pCXND3-LL2DB）および、RFB4diabody発現ベクター（pCXND3-RFB4DB）の構築を終了した。

- 23 -

[実施例 2] CD22diabodyの精製

(1) LL2diabody発現細胞株の樹立と培養上清の回収

PvuIで切断し、直鎖化したpCXND3-LL2DB 20  $\mu$ gをDG44細胞に以下のようにelectroporation法により導入した。DG44細胞をice-cold PBSで2回洗浄した後1X10<sup>7</sup>/mlになるようにPBSに懸濁した。これに20  $\mu$ gの上記プラスミドを混合し、電気パルス (1.5KV, 25  $\mu$ FD) を与えた。適当な割合で細胞を希釈し96well plateに撒きこみ、終濃度500  $\mu$ g/ml G418 (GIBCO) 存在下で培養を行った。生育したコロニーを含むwellより~30クローンほどピックアップし、それら培養上清中のdiabodyの発現をウエスタンプロットにより調べた。発現の認められたクローンを拡大後、これをLL2diabody高產生細胞株とした。T-175フラスコ中でコンフルエンントになったLL2diabody高產生細胞株を2本のローラーボトル(CHO-S-SFMII培地(GIBCO) 250ml)に移し、5日後に培養上清を回収した。遠心によって死細胞を除去した後、0.45  $\mu$ mのフィルターを通してこれをLL2diabodyの精製に用いた。

(2) RFB4diabodyのcos7での一過性発現と培養上清の回収

pCXND3-RFB4DB 20  $\mu$ gをCOS7細胞に以下のようにelectroporation法により導入した。COS7細胞をice-cold PBSで2回洗浄した後1X10<sup>7</sup>/mlになるようにPBSに懸濁した。これに20  $\mu$ gの上記プラスミドを混合し、電気パルス (220V, 950  $\mu$ FD) を与えた。その後全細胞をT-225フラスコ3本に巻き込み(DMEM+10%FCS)、3日後に培養上清を回収した。遠心によって死細胞を除去した後、0.45  $\mu$ mのフィルターを通してこれをRFB42diabodyの精製に用いた。

(3) diabodyの精製

diabodyの精製は以下のとおり行った。回収した各培養上清にAnti-Flag M2 Agarose (SIGMA) を加え、一晩4°Cで混合することによりdiabodyを吸着させた。Anti-Flag M2 Agarose を遠心により回収しPBSで数回洗浄した後、溶出Buffer (100mM Glycine H3.5, 0.01% Tween 20) でdiabodyを溶出した。回収したサンプルは直ちに終濃度25mMになるようにTris-HCl pH8.0で中和した。これを濃縮し、0.01% Twe

- 2 4 -

en 20を含むPBSにバッファー置換した。回収したサンプルの一部をSDS電気泳動し、抗FLAG抗体によるウエスタンプロット、および、クマシ染色を行い、目的の蛋白が精製されていることを確認した。

[実施例3] CD22diabodyのリンパ腫細胞への結合の確認

5 精製したLL2diabody、または、RFB4diabodyを2%FCS、0.02%NaN<sub>3</sub>を含むPBS中でそれぞれ終濃度が20 μg/ml、8 μg/mlになるようにBリンパ腫細胞株Raji細胞に加え、氷上で1時間反応させた。続いて、抗Flag M2抗体を加え、さらに氷上で1時間反応させた。細胞を洗浄後、FITC-抗マウスIgGと氷上で30分反応させた後、細胞表面への結合をflow cytometryを用いて測定した (EPICS ELITE, COULTER) 。

10 [実施例4] CD22diabodyによるリンパ腫細胞の細胞死誘導活性の解析

Bリンパ腫細胞株、Raji、及び、Daudiを、2~5 X 10<sup>5</sup> cells/wellになるように24 well plateに細胞を撒いた。これに、精製したLL2diabody、またはRFB4diabodyを添加し37°Cで培養を続けた。20時間後細胞を回収し、PIを加え室温で15分反応させることで死細胞をラベルした。その後、flow cytometryを用いて染色された死細胞の割合を測定した (EPICS ELITE, COULTER) 。

産業上の利用の可能性

本発明によって、高比活性の低分子化抗体を提供できるものと期待される。該低分子化抗体を使用することで、短い半減期でも十分な薬効が期待でき、さらに、20薬効と毒性の乖離が可能になるものと期待できる。また、臨床投与量の低減化および生産コストの低減化など、コスト全体の低減化が図れるので抗体医薬品の開発上問題になる経済面問題の改善もまた期待される。

## 請求の範囲

1. CD22を認識する低分子化抗体。
2. Diabodyである請求項1に記載の低分子化抗体。
- 5 3. 以下の(a)～(f)のいずれかに記載の低分子化抗体。
  - (a) 配列番号：1または3に記載のアミノ酸配列を有する低分子化抗体。
  - (b) 配列番号：1または3に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する低分子化抗体であって、(a)に記載の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。
  - (c) 配列番号：5のCDRおよび配列番号：7のCDRのアミノ酸配列を有する低分子化抗体。
  - (d) 配列番号：5のCDRおよび配列番号：7のCDRのアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する低分子化抗体であって、(c)に記載の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。
  - (e) 配列番号：9のCDRおよび配列番号：11のCDRのアミノ酸配列を有する低分子化抗体。
  - (f) 配列番号：9のCDRおよび配列番号：11のCDRのアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有する低分子化抗体であって、(c)に記載の低分子化抗体と機能的に同等な低分子化抗体。
4. CD22を認識する抗体を低分子化することによって、活性が上昇した抗体を製造する方法。
- 25 5. 低分子化がDiabody化である、請求項4に記載の方法。
6. 活性がアポトーシス誘導活性である、請求項4または5に記載の方法。

- 2 6 -

7. 請求項 1～3 のいずれかに記載の低分子化抗体、請求項 4～6 のいずれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体を有効成分として含有する、アポトーシス誘導剤。
8. 腫瘍細胞に対するアポトーシスを誘導する、請求項 7 に記載のアポトーシス誘導剤。  
5
9. 腫瘍細胞がリンパ腫細胞または白血病細胞である、請求項 8 に記載のアポトーシス誘導剤。
10. 請求項 1～3 のいずれかに記載の低分子化抗体、請求項 4～6 のいずれかに記載の方法によって製造される低分子化抗体を有効成分として含有する、抗腫瘍剤。  
10
11. 腫瘍が血液腫瘍である、請求項 10 に記載の抗腫瘍剤。
12. 抗体がDiabodyである、請求項 7 から 9 のいずれかに記載のアポトーシス誘導剤。
13. 抗体がDiabodyである、請求項 10 または 11 に記載の抗腫瘍剤。

1 / 5

一

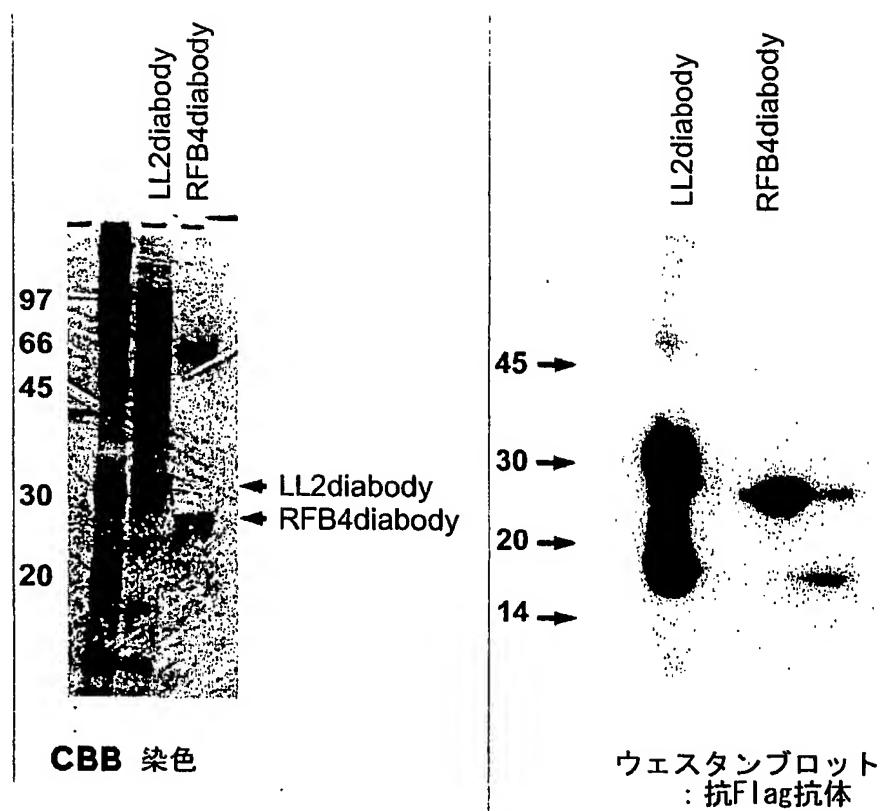
2 / 5

図 2

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
cctgaattccaccatgaactttggcgtcagattgatitccctgtcattactttaaaagggtgtgaagtgtgaagtgcagctggtagtctggggagcc M N F G L R L I F L V L T L K G V K C E V Q L V E S G G G									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
ttagtgaaggcctggagggtccctgaaacttcctgtgcagcctctggattcgcttcagtatcatgacatgtctgggttcgccagactccggagaaga L V K P G G S L K L S C A A S G F A F S I Y D M S W V R Q T P E K R									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
ggctggagtgggtcgatacattagtagtgtgggttaccacactatccagacactgtgaaggcccattccagagacaatgccaagaa L E W V A Y I S S G G G T T Y Y P D T V K G R F T I S R D N A K N									
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
cacccctgtacacctgcaaatgagcagtcgtcgaagtctgaggacacagccatgtattactgtcaagacatagtggctacggtagtagctacgggttttgttt T L Y L Q M S S L K S E D T A M Y Y C A R H S G Y G S S Y G V L F									
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
gcttactggggccaagggtactggtaactgtctgtcagggtggaggcggtacgcataatccagatgaccagactacatccctccctgtctgcctctctgg A Y W G Q G T L V T V S A G G G G S D I O M T Q T T S S L S A S L G									
510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
gagacagagtccatttagttgcaggcaagtcaaggacattagcaattttaaactgttatcagcagaaaccagatggaactgttaactcctgatcta D R V T I S G R A S Q D I S N Y L N W Y Q Q K P D G T V K L L I Y									
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
ctacacatcaatattacactcaggagtcccatcaaagttagtggcagtgggtctggaaacagattattcttcaccattagcaacctggagcaagaagat Y T S I L H S G V P S K F S G S G S G T D Y S L T I S N L E Q E D									
710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
tttgccacttaactttgccaacaggtaatacgtttccgtggacgttcgtggaggccaccaagctggaaatcaaagactacaaggatgacgacgataagt F A T Y F C Q Q G N T L P W T F G G G T K L E I K D Y K D D D D K *									
810	820								
gataagcggccgcaat									
*									

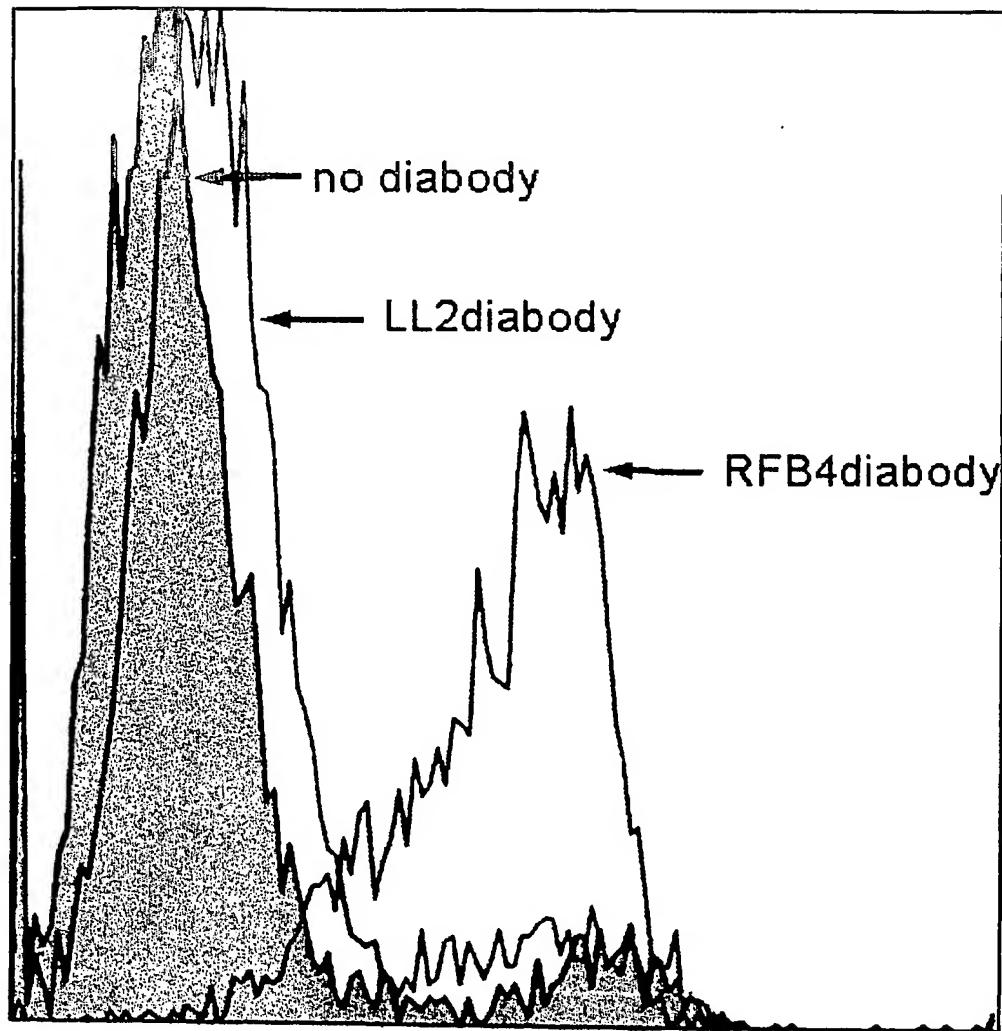
3 / 5

図 3



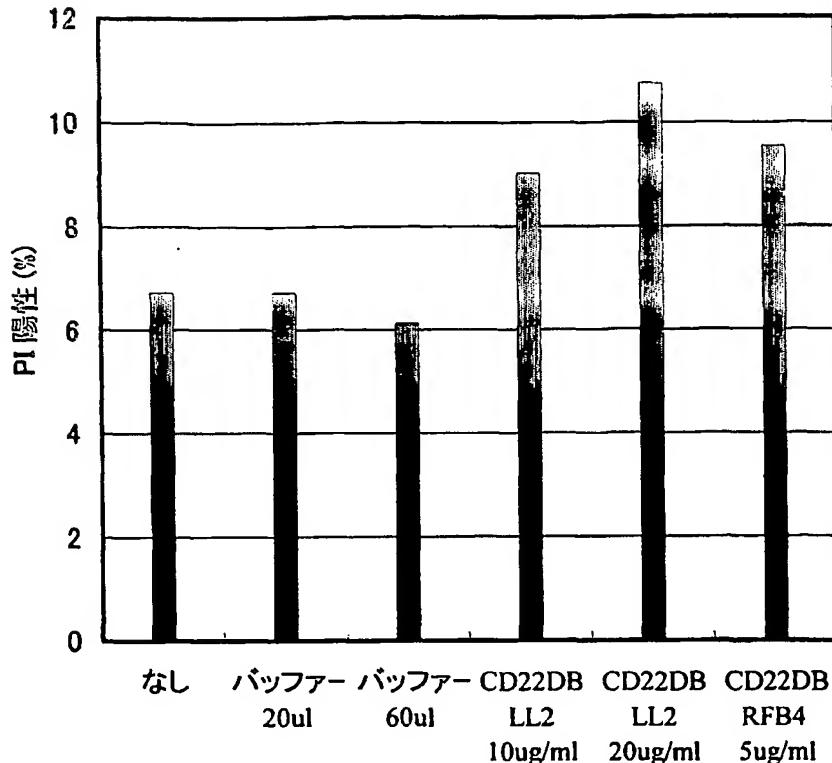
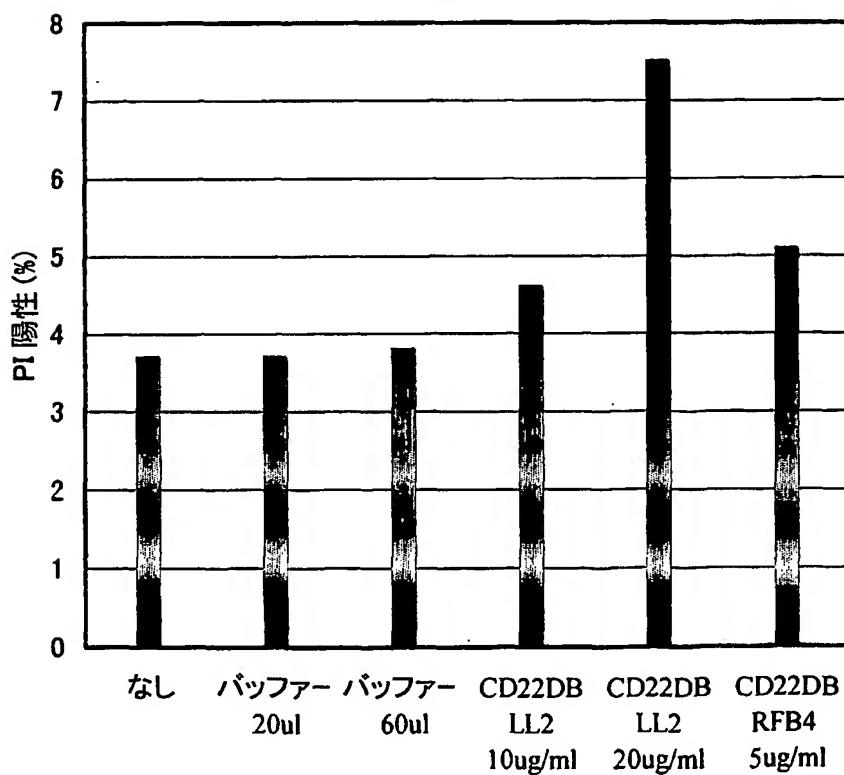
4 / 5

図 4



5 / 5

図 5

*Daudi**Raji*

1 / 3 7

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Genetically engineered-antibodies against CD22 and use thereof

<130> C1-A0305P

<150> JP 2003-96950

<151> 2003-03-31

<160> 36

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 260

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 1

Met Glu Arg His Trp Ile Phe Leu Phe Leu Phe Ser Val Thr Ala Gly

2 / 3 7

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Ser Lys

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Leu His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn

65 70 75 80

Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly

115 120 125

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu

130 135 140

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly Glu Asn Val Thr

3 / 3 7

145                    150                    155                    160

Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ala Asn His Lys

165                    170                    175

Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu

180                    185                    190

Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

195                    200                    205

Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val

210                    215                    220

Gln Val Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Ser Ser

225                    230                    235                    240

Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp

245                    250                    255

Asp Asp Asp Lys

260

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 810

4 / 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

220

<221> CDS

<222> (14) .. (799)

223

<400> 2

cctgaattcc acc atg gaa agg cac tgg atc ttt ctc ttc ctg ttt tca 49  
Met Glu Arg His Trp Ile Phe Leu Phe Leu Phe Ser  
1 5 10

gta act gca ggt gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag gag tca ggg gct 97  
Val Thr Ala Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala  
15 20 25

gaa ctg tca aaa cct ggg gcc tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct      145  
 Glu Leu Ser Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser  
                   30                  35                  40

ggc tac acc ttt act agc tac tgg ctg cac tgg ata aaa cag agg cct 193  
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His Trp Ile Lys Gln Arg Pro

5 / 37

45	50	55	60
gga cag ggt ctg gaa tgg att gga tac att aat cct agg aat gat tat			241
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr			
65	70	75	
act gag tac aat cag aac ttc aag gac aag gcc aca ttg act gca gac			289
Thr Glu Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp			
80	85	90	
aaa tcc tcc agc aca gcc tac atg caa ctg agc agc ctg aca tct gag			337
Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu			
95	100	105	
gac tct gca gtc tat tac tgt gca aga agg gat att act acg ttc tac			385
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Ile Thr Thr Phe Tyr			
110	115	120	
tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tcg ggt gga ggc ggt agc			433
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser			
125	130	135	140
gac att cag ctg acc cag tct cca tca tct ctg gct gtg tct gca gga			481
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly			
145	150	155	

6 / 3 7

gaa aac gtc act atg agc tgt aag tcc agt caa agt gtt tta tac agt 529  
Glu Asn Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
160 165 170

gca aat cac aag aac tac ttg gcc tgg tac cag cag aaa cca ggg cag 577  
Ala Asn His Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
175 180 185

tct cct aaa ctg ctg atc tac tgg gca tcc act agg gaa tct ggt gtc 625  
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
190 195 200

cct gat cgc ttc aca ggc agc gga tct ggg aca gat ttt act ctt acc 673  
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
205 210 215 220

atc agc aga gta caa gtt gaa gac ctg gca att tat tat tgt cac caa 721  
Ile Ser Arg Val Gln Val Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln  
225 230 235

tac ctc tcc tcg tgg acg ttc ggt gga ggg acc aag ctg gag atc aaa 769  
Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
240 245 250

gac tac aag gat gac gac gat aag tga taa gcggccgcaa t 810  
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

7 / 3 7

255

260

<210> 3

<211> 262

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 3

Met Asn Phe Gly Leu Arg Leu Ile Phe Leu Val Leu Thr Leu Lys Gly

1

5

10

15

Val Lys Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys

20

25

30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe

35

40

45

Ser Ile Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu

50

55

60

Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro

65

70

75

80

8 / 3 7

Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Ala Lys Asn

85

90

95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met

100

105

110

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu

115

120

125

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly

130

135

140

Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala

145

150

155

160

Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile

165

170

175

Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys

180

185

190

Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Lys

195

200

205

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn

9 / 37

210

215

220

Leu Glu Gln Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr

225

230

235

240

Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr

245

250

255

Lys Asp Asp Asp Asp Lys

260

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 816

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized DNA sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (14)..(805)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 4

10 / 37

cctgaattcc acc atg aac ttt ggg ctc aga ttg att ttc ctt gtc ctt 49

Met Asn Phe Gly Leu Arg Leu Ile Phe Leu Val Leu

1 5 10

act tta aaa ggt gtg aag tgt gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga 97

Thr Leu Lys Gly Val Lys Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly

15 20 25

ggc tta gtg aag cct gga ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct 145

Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser

30 35 40

gga ttc gct ttc agt atc tat gac atg tct tgg gtt cgc cag act ccg 193

Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro

45 50 55 60

gag aag agg ctg gag tgg gtc gca tac att agt agt ggt ggt ggt acc 241

Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Thr

65 70 75

acc tac tat cca gac act gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac 289

Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

80 85 90

aat gcc aag aac acc ctg tac ctg caa atg agc agt ctg aag tct gag 337

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu

11 / 37

95 100 105

gac aca gcc atg tat tac tgt gca aga cat agt ggc tac ggt agt agc 385  
Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser

110 115 120

tac ggg gtt ttg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc 433  
Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
125 130 135 140

tct gca ggt gga ggc ggt agc gat atc cag atg acc cag act aca tcc 481  
Ser Ala Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser  
145 150 155

tcc ctg tct gcc tct ctg gga gac aga gtc acc att agt tgc agg gca 529  
Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala  
160 165 170

agt cag gac att agc aat tat tta aac tgg tat cag cag aaa cca gat 577  
Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp  
175 180 185

gga act gtt aaa ctc ctg atc tac tac aca tca ata tta cac tca gga 625  
Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly  
190 195 200

1 2 / 3 7

gtc cca tca aag ttc agt ggc agt ggg tct gga aca gat tat tct ctc        673

Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu

205                          210                          215                          220

acc att agc aac ctg gag caa gaa gat ttt gcc act tac ttt tgc caa        721

Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln

225                          230                          235

cag ggt aat acg ctt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa        769

Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu

240                          245                          250

atc aaa gac tac aag gat gac gac gat aag tga taa gcggccgcaa t        816

Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys

255                          260

<210> 5

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized peptide sequence

13 / 37

&lt;400&gt; 5

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Ser Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Leu His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Asn Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Asp Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

1 4 / 3 7

<210> 6

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(348)

<223>

<400> 6

cag gtc cag ctg cag gag tca ggg gct gaa ctg tca aaa cct ggg gcc                  48  
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Ser Lys Pro Gly Ala  
1                        5                        10                        15

tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttt act agc tac                  96  
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20                        25                        30

tgg ctg cac tgg ata aaa cag agg cct gga cag ggt ctg gaa tgg att                  144  
Trp Leu His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35                        40                        45

1 5 / 3 7

gga tac att aat cct agg aat gat tat act gag tac aat cag aac ttc        192

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Asn Phe

50

55

60

aag gac aag gcc aca ttg act gca gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac        240

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

atg caa ctg agc agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt        288

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

gca aga agg gat att act acg ttc tac tgg ggc caa ggc acc act ctc        336

Ala Arg Arg Asp Ile Thr Thr Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

100

105

110

aca gtc tcc tcg        348

Thr Val Ser Ser

115

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

16 / 37

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized peptide sequence

&lt;400&gt; 7

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly  
1 5 10 15

Glu Asn Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
20 25 30

Ala Asn His Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Gln Val Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln  
85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

1 7 / 3 7

<210> 8

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

<223>

<400> 8

gac att cag ctg acc cag tct cca tca tct ctg gct gtg tct gca gga 48  
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly  
1 5 10 15

gaa aac gtc act atg agc tgt aag tcc agt caa agt gtt tta tac agt 96  
Glu Asn Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
20 25 30

gca aat cac aag aac tac ttg gcc tgg tac cag cag aaa cca ggg cag 144  
Ala Asn His Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

18 / 37

tct cct aaa ctg ctg atc tac tgg gca tcc act agg gaa tct ggt gtc 192

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

cct gat cgc ttc aca ggc agc gga tct ggg aca gat ttt act ctt acc 240

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

atc agc aga gta caa gtt gaa gac ctg gca att tat tat tgt cac caa 288

Ile Ser Arg Val Gln Val Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln

85 90 95

tac ctc tcc tcg tgg acg ttc ggt gga ggg acc aag ctg gag atc aaa 336

Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 9

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized peptide sequence

<400> 9

19 / 37

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120

20 / 37

&lt;211&gt; 369

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized DNA sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(369)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 10

gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg        48  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1                    5                    10                    15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc gct ttc agt atc tat        96  
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr  
20                    25                    30

gac atg tct tgg gtt cgc cag act ccg gag aag agg ctg gag tgg gtc        144  
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35                    40                    45

gca tac att agt agt ggt ggt acc acc tac tat cca gac act gtg        192

21 / 37

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tac 240

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

ctg caa atg agc agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg tat tac tgt 288

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

gca aga cat agt ggc tac ggt agt agc tac ggg gtt ttg ttt gct tac 336

Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr

100 105 110

tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca 369

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

22 / 37

&lt;223&gt; an artificially synthesized peptide sequence

&lt;400&gt; 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

&lt;210&gt; 12

23 / 37

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

220

<221> CDS

$\langle 222 \rangle$  (1) .. (321)

223

<400> 12

gat atc cag atg acc cag act aca tcc tcc ctg tct gcc tct ctg gga 48  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1                5                10                15

gac aga gtc acc att agt tgc agg gca agt cag gac att agc aat tat 96  
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
                   20                  25                  30

tta aac tgg tat cag cag aaa cca gat gga act gtt aaa ctc ctg atc 144  
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

tac tac aca tca ata tta cac tca gga gtc cca tca aag ttc agt ggc 192

24 / 37

Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly

50 55 60

agt ggg tct gga aca gat tat tct ctc acc att agc aac ctg gag caa 240

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

gaa gat ttt gcc act tac ttt tgc caa cag ggt aat acg ctt ccg tgg 288

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp

85 90 95

acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa 321

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 88

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; an artificially synthesized DNA sequence

&lt;400&gt; 13

cctgaattcc accatggaaa ggcactggat ctttcttttc ctgttttcag taactgcagg 60

25 / 37

tgtccactcc caggtccagc tgcaggag 88

<210> 14

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 14

gatgtcctgc aaggcttctg gctacacctt tactagctac tggctgcact ggataaaaca 60

gaggcctgga cagggctgg aatggattgg 90

<210> 15

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

2 6 / 3 7

<400> 15

cttcaaggac aaggccacat tgactgcaga caaatcctcc agcacagcct acatgcaact 60

gagcagcctg acatctgagg actctgc 87

<210> 16

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 16

ggcaccactc tcacagtctc ctcgggtgga ggcggtagcg acattcagct gacccagtct 60

ccatcatctc tggctgtgtc tgcaggag 88

<210> 17

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

27 / 37

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 17

cagtgc当地 cacaagaact acttggcctg gtaccagcag aaaccaggc agtctcctaa 60

actgctgatc tactggcat ccactaggga a 91

<210> 18

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 18

ggcagcggat ctgggacaga ttttactctt accatcagca gagtacaagt tgaagacctg 60

gcaatttatt attgtcacca atacctctcc tcgtggacgt tcgggt 105

<210> 19

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial

28 / 37

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 19

ggtagtgcga gaaggcttgc aggacatctt cactgaggcc ccaggtttg acagttcagc 60

ccctgactcc tgcagctgga cctgggagtg g 91

<210> 20

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 20

tgcagtcaat gtggcattgt cttgaagtt ctgattgtac tcagtataat cattcctagg 60

attaatgtat ccaatccatt ccagaccctg tccagg 96

<210> 21

<211> 105

2 9 / 3 7

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 21

acccgaggag actgtgagag tggtgccttg gccccagtag aacgtagtaa tatcccttct 60

tgcacagtaa tagactgcag agtcctcaga tgtcaggctg ctcag 105

<210> 22

<211> 102

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 22

ccaggccaag tagttcttgt gatttgcact gtataaaaca ctttgactgg acttacagct 60

catagtgacg ttttctcctg cagacacagc cagagatgat gg 102

3 0 / 3 7

<210> 23

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 23

aagagtaaaa tctgtccca g atccgctgcc tgtgaagcga tcaggacac cagattccct 60

agtggatgcc c agtagatca gcag 84

<210> 24

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 24

attgcggccg cttatcac tt atcgctgtca tccttgtagt ct tttgatctc cagcttggtc 60

cctccaccga acgtccacga ggagaggtat tgg 93

3 1 / 3 7

<210> 25

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 25

cctgaattcc accatgaact ttgggctcag attgattttc cttgtcctta cttaaaagg 60

tgtgaagtgt gaagtgcagc tggtggagtc tg 92

<210> 26

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 26

gtgcagcctc tggattcgct ttcagtatct atgacatgtc ttgggttcgc cagactccgg 60

3 2 / 3 7

agaagaggct ggagtgggtc gcatacatt 89

<210> 27

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 27

gggccgattc accatctcca gagacaatgc caagaacacc ctgtacctgc aaatgagcag 60

tctgaagtct gaggacacag ccatgt

86

<210> 28

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

3 3 / 3 7

<400> 28

cggggttttg tttgcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctg caggtggagg 60

cggtagcgat atccagatga cccagactac atcctccc 98

<210> 29

<211> 114

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 29

ttgcagggca agtcaggaca ttagcaatta tttaaactgg tatcagcaga aaccagatgg 60

aactgttaaa ctcctgatct actacacatc aatattacac tcaggagtcc catc 114

<210> 30

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

3 4 / 3 7

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 30

ctctcaccat tagcaacctg gagcaagaag attttgcac ttactttgc caacaggta 60

atacgcttcc gtggacgttc ggtggag 87

<210> 31

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 31

ctgaaagcga atccagaggc tgcacaggag agtttcaggg accctccagg cttcactaag 60

cctcccccag actccaccag ctgcacttca c 91

<210> 32

<211> 91

<212> DNA

<213> Artificial

35 / 37

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 32

gtctctggag atggtaatc ggcccttcac agtgtctgga tagtaggtgg taccaccacc 60

actactaatg tatgcgaccc actccagcct c 91

<210> 33

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 33

ggccccagta agcaaacaaa accccgttagc tactaccgta gccactatgt ctgcacagt 60

aatacatggc tgtgtcctca gacttcagac 90

<210> 34

<211> 90

3 6 / 3 7

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 34

taattgctaa tgtcctgact tgccctgcaa ctaatggtga ctctgtctcc cagagaggca 60

gacagggagg atgttagtctg ggtcatctgg 90

<210> 35

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 35

tcttgctcca ggttgcta at ggtgagagaa taatctgttc cagaccact gccactgaac 60

tttgatggga ctcctgagtg taatattgat gtg 93

3 7 / 3 7

<210> 36

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized DNA sequence

<400> 36

attgcggccg cttatcactt atcgtcgtca tccttgtagt ctttgatttc cagcttggtg 60

cctccaccga acgtccacgg aagcg 85

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004696

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/28, C12N15/62, A61K39/395, A61P1/04, 1/16, 3/10, 5/14, 7/00, 7/04, 7/06, 11/06, 15/08, 17/00, 17/06, 21/04, 25/00, 27/02, 29/00, 35/00, 35/02, 37/02, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/28, C12N15/62, A61K39/395, A61P1/04, 1/16, 3/10, 5/14, 7/00, 7/04, 7/06, 11/06, 15/08, 17/00, 17/06, 21/04, 25/00, 27/02, 29/00, 35/00, 35/02, 37/02, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JICST FILE (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 01/97858 A2 (IDEC Pharmaceuticals Corp.), 27 December, 2001 (27.12.01), & JP 2004-512262 A & EP 1299128 A2 & US 2002/0039557 A1	1, 2, 4-13 3
X Y	WO 02/22212 A2 (IDEC Pharmaceuticals Corp.), 21 March, 2002 (21.03.02), & JP 2004-508420 A & EP 1328320 A2 & US 2002/0058029 A1	1, 2, 4-13 3
X Y	WO 01/74388 A1 (IDEC Pharmaceuticals Corp.), 11 October, 2001 (11.10.01), & JP 2004-500412 A & EP 1283722 A1 & US 2002/0012665 A1	1, 2, 4-13 3

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
06 July, 2004 (06.07.04)Date of mailing of the international search report  
27 July, 2004 (27.07.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004696

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/04021 A1 (IDEC Pharmaceuticals Corp.),	1,2,4-13
Y	17 January, 2002 (17.01.02), & JP 2004-502742 A & EP 1305045 A1 & US 2002/0028178 A1	3
X	JP 2001-518930 A (Immunomedics, Inc.),	1,4,6-11
Y	16 October, 2001 (16.10.01), & WO 98/42378 A1 & EP 969866 A1 & US 2002/0071807 A1	2,3,5,12,13
X	JP 2002-544173 A (Immunomedics, Inc.),	1,4,6-11
Y	24 December, 2002 (24.12.02), & WO 00/67795 A1 & EP 1178826 A1	2,3,5,12,13
X	JP 10-505231 A (Immunomedics, Inc.),	1,4,6-11
Y	26 May, 1998 (26.05.98), & WO 96/04925 A1 & EP 771208 A1 & US 5789554 A	2,3,5,12,13
Y	HOLLIGER P. et al., "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments., Proc.Natl. Acad.Sci.USA., 1993, No.90, Vol.14, p.6444-8	2,3,5,12,13
P,X	WO 03/33654 A2 (ROSSI Edmund), 24 April, 2003 (24.04.03), & US 2003/0148409 A1	1-13

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/004696

**Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
  - a. type of material
    - a sequence listing
    - table(s) related to the sequence listing
  - b. format of material
    - in written format
    - in computer readable form
  - c. time of filing/furnishing
    - contained in the international application as filed
    - filed together with the international application in computer readable form
    - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004696

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

It is recognized that degraded antibodies recognizing CD22, i.e., the matter common to claims 1 to 13, have been publicly known (see, if needed, WO98/42378). Thus, the above common matter cannot be considered as a special technical feature. Such being the case, the inventions as set forth in claims 1 to 13 cannot be regarded as a group so linked as to form a single general inventive concept.

Thus, the inventions as set forth in claims 1 to 13 are classified into the following 4 groups of inventions: (1) a degraded antibody having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, (2) a degraded antibody having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:3, (continued to extra sheet)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
The parts relating to SEQ ID NO:1 in claims 1 to 13

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004696

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

(3) a degraded antibody having CDR of SEQ ID NO:5 and the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:7, and (4) a degraded antibody having CDR of SEQ ID NO:9 and the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:11.

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl. 7 C07K16/28, C12N15/62, A61K39/395, A61P1/04, 1/16, 3/10, 5/14, 7/00, 7/04, 7/06, 11/06, 15/08, 17/00, 17/06  
, 21/04, 25/00, 27/02, 29/00, 35/00, 35/02, 37/02, 43/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl. 7 C07K16/28, C12N15/62, A61K39/395, A61P1/04, 1/16, 3/10, 5/14, 7/00, 7/04, 7/06, 11/06, 15/08, 17/00, 17/06  
, 21/04, 25/00, 27/02, 29/00, 35/00, 35/02, 37/02, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

MEDLINE(STN) BIOSIS(STN) WPIDS(STN) JICSTファイル(JOIS)  
SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/97858 A2 (アイデイック フーマスティカルズ コーポレイション) 2001.12.27	1, 2, 4-13
Y	& JP 2004-512262 A & EP 1299128 A2 & US 2002/0039557 A1	3
X	WO 02/22212 A2 (アイデイック フーマスティカルズ コーポレイション) 2002.03.21	1, 2, 4-13
Y	& JP 2004-508420 A & EP 1328320 A2 & US 2002/0058029 A1	3
X	WO 01/74388 A1 (アイデイック フーマスティカルズ コーポレイション) 2001.10.11	1, 2, 4-13
Y	& JP 2004-500412 A & EP 1283722 A1 & US 2002/0012665 A1	3

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に旨及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

06.07.2004

## 国際調査報告の発送日

27.7.2004

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官（権限のある職員）

田中 晴絵

4 N 9739

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C(続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	WO 02/04021 A1 (アイデイック ファーマスティカルズ コーポレレイション) 2002.01.17	1, 2, 4-13
Y	& JP 2004-502742 A & EP 1305045 A1 & US 2002/0028178 A1	3
X	JP 2001-518930 A (イムメディックス インコーポレイテッド) 2001.10.16	1, 4, 6-11
Y	& WO 98/42378 A1 & EP 969866 A1 & US 2002/0071807 A1	2, 3, 5, 12, 13
X	JP 2002-544173 A (イムメディックス インコーポレイテッド) 2002.12.24	1, 4, 6-11
Y	& WO 00/67795 A1 & EP 1178826 A1	2, 3, 5, 12, 13
X	JP 10-505231 A (イムメディックス インコーポレイテッド) 1998.05.26	1, 4, 6-11
Y	& WO 96/04925 A1 & EP 771208 A1 & US 5789554 A	2, 3, 5, 12, 13
Y	HOLLIGER P. et al., "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments., Proc Natl Acad Sci U S A., 1993, No. 90, Vol. 14, p. 6444-8	2, 3, 5, 12, 13
P X	WO 03/33654 A2 (ROSSI Edmund) 2003.04.24 & US 2003/0148409 A1	1-13

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-1-3に共通する事項である、CD22を認識する低分子化抗体は、公知であったと認められるため（要すれば、WO98/42378号等参照。）、上記共通する事項は特別な技術的特徴とは認められず、よって、請求の範囲1-1-3記載の発明が单一的一般的発明概念を形成するように関連しているとは認められない。

したがって、請求の範囲1-1-3に記載の発明は、（1）配列番号：1に記載のアミノ酸配列を有する低分子化抗体、（2）配列番号：3に記載のアミノ酸配列を有する低分子化抗体、（3）配列番号：5のCDRおよび配列番号：7のCDRのアミノ酸配列を有する低分子化抗体、及び、（4）配列番号：9のCDRおよび配列番号：11のCDRのアミノ酸配列を有する低分子化抗体、に関する、4の発明群に区分される。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

1-1-3の配列番号1に関する部分

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。